

**İNSAN PLASENTA VE ENDOTEL HÜCRE HATLARI İLE
3B KRİYOJEL ORTAK KÜLTÜR SİSTEMİNİN
OLUŞTURULMASI VE ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**CONSTRUCTION OF A 3D CRYOGEL CO-CULTURE
SYSTEM USING HUMAN PLACENTAL AND
ENDOTHELIAL CELL LINES AND INVESTIGATING ITS
EFFICIENCY**

MERVE DEMİR

DOÇ. DR. AYSUN KILIÇ SÜLOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

İNSAN PLASENTA VE ENDOTEL HÜCRE HATLARI İLE 3B KRIYOJEL ORTAK KÜLTÜR SİSTEMİNİN OLUŞTURULMASI VE ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Merve DEMİR

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Aysun KILIÇ SÜLOĞLU

Ocak 2022, 129 sayfa

Gebelik ile birlikte oluşan plasenta bariyeri, yapısı ve transfer kapasitesi ile besin maddelerinin maternal-fetal geçişini, geçiş gradiyentini, feto-plasental ve utero-plasental kan akışını belirlemektedir. Gebelik boyunca kimyasal madde ve ilaç kullanımına maruz kalma oranlarında büyük bir artış meydana gelmiştir. İnsanlar üzerinde etik kısıtlamalar sebebi ile testler yapılamamaktadır. Plasenta bariyerinin geçirgenliği hakkındaki eksikliği tamamlamak için güncel plasenta bariyer modelleri oluşturularak yapılacak olan çalışmalara ihtiyaç artmıştır.

Bu tez çalışmasında, insan plasenta koryokarsinom hücreleri (BeWo) ve insan göbek kordonu ven hücreleri (HUVEC) ile birlikte üç boyutlu (3B) ortamda farklı özellikler ile hazırlanmış kriyojel üzerinde mono ve ortak kültür sistemleri oluşturulmuştur. Kriyojeller, hücrelerin tutunmasını ve çoğalmasını sağlayabilecek birbirleriyle bağlantılı makro gözeneklerden oluşmaktadırlar. Tez çalışmasında, 3B por yapısına sahip biyouyumlu poli (2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA) kriyojeller, hücre dışı maddeler (HDM) açısından desteklenerek *in vivo*'ya daha yakın bir sistem oluşturulmuştur. PHEMA temelli kriyojel kullanılarak jelatin içeren kriyojeller (PHEMAGEL) sentezlenmiştir. Tüm PHEMA ve PHEMAGEL kriyojellere folik asit

(FA) bağlanmıştır, ayrıca fibronektin (FN) veya kolajen tip IV (KOL Tip IV) yapıya katılarak plasenta dokusuna yakın bir ortam oluşturulmuştur. Farklı içerikler ile sentezlenmiş olan 4 kriyojel grubunun PHEMA, PHEMA+KOL Tip IV, PHEMAGEL ve PHEMAGEL+FN'in karakterizasyon çalışmaları kapsamında şişme testleri yapılarak jellerin şişme özellikleri değerlendirilmiştir. Jelatin, FA, FN ve KOL Tip IV'ün kriyojellerin yapısına katılıp katılmadığı fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektrometresi ile incelenmiştir. Mikro bilgisayarlı tomografi (Mikro-CT) ile kriyojellerin 3B karakterizasyon analizleri yapılmıştır. Kriyojellerin gözenek boyutlarını ve hücrelerin tutunma potansiyelleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. FA bağlanan kriyojellere *in vitro* salım analizleri yapılmıştır. Sentezlenen kriyojel gruplarının sito-uyumluluğunu ve hücrelerin proliferasyon yeteneklerini inceleyebilmek için 2, 4 ve 7 gün boyunca hücreler ile birlikte inkübe edilmiştir ve hücrelerin canlılıkları değerlendirilmiştir. Gebelikteki kullanımı ile ilgili literatürde yeterli bilgiye rastlanmamış bir antidepresan etken maddesi olan Vortiksetin, oluşturulan 3B kriyojel ortak-kültür sisteminde değerlendirilmiştir. 30 µM ve 60 µM'lık konsantrasyonlarda 2, 4 ve 7 gün boyunca hücrelerle inkübe edilmiştir. 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT) canlılık analizi ile etkinliği incelenmiştir. İnsan koryonik gonadotropin (β -hCG) hormon üretim miktarı ve matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2) ile matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) protein seviyeleri ölçülmüştür.

Kriyojellerin şişme özellikleri incelendiğinde PHEMA temelli kriyojellerde makrogözenek derecesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Jelatine bağlı olarak makrogözeneklilik derecesi, şişme derecesi ve şişme oranlarında düşüş gözlenmiştir. FTIR analizi sonucuna göre jelatinin, FA'nın, FN'nin ve KOL Tip IV'ün kriyojellerin yapısına başarılı bir şekilde katıldıkları görülmüştür. Mikro-CT sonucu kriyojellerin farklı gözenek boyutlarında dağılıma sahip olduğunu göstermiştir. Bu durum hücrelerin tutunmasında ve çoğalmasında artış sağlamıştır. SEM görüntüleri ile birbiriyle bağlantılı oldukça geniş gözeneklere sahip kriyojellerin sentezlendiği görülmüştür. FA'nın *in vitro* salımında inkübasyon süresine bağlı olarak azalma görülmüştür. Kriyojellerin sito-uyumluluğunu anlayabilmek için yapılan MTT analizi sonucunda hücrelerin çeşitli özellikler ile sentezlenen kriyojellere uyumlu olduğu, hücreler üzerinde toksik bir etki yaratmadığı gözlenmiştir. 3B kriyojel ortak kültür

sistemine Vortioksetinin yüksek dozlarında mono kültürlerde hücre canlılığında azalma görülmüştür ancak ortak kültürün aynı dozlarındaki hücre canlılığında beklenen azalma görülmemiştir. BeWo ve ortak kültür grubunda β -hCG hormon miktarı ölçülmüştür ve PHEMA+KOL Tip IV'ün BeWo hücresinde en fazla hormon salımı görülmüştür. MMP-2 ve MMP-9 protein seviyelerinde Vortioksetin doz uygulamasına bağlı olarak anlamlı azalma görülmemiştir.

Bu tez çalışmasında, yapısında jelatin, FN ve KOL Tip IV içeren kriyojeller sentezlenerek FA ile bağlanmıştır. Plasental BeWo ve endotelial HUVEC hücreleriyle biyouyumlulukları gösterilmiş ve ortak kültür ortamında ilk kez PHEMA kriyojeller üzerinde üretilmiştir. Oluşturulan 3B sistem ile gebelikte kullanılan Vortioksetin antidepresan etken maddesinin toksisitesi değerlendirilmiştir. Sonuçlar kriyojel sisteminin mono ve ortak kültürler için biyouyumlu olduğunu, sitotoksosite açısından ise mono kültürlerle kıyasla ikili ortak kültür gruplarında canlılığı düşürmek için dozların daha yüksek olması gerektiğini göstermiştir. Bu 3B kriyojel sistemi yeni ilaç, kozmetik madde, gıda toksisitesi gibi alanlarda *in vivoyu* yansıtan ve benzer cevaplar veren bir sistem olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Placenta Bariyer Modeli, BeWo, HUVEC, Kriyojel, PHEMA, Folik Asit, Fibronektin, Kolajen Tip IV, Vortioksetin, β -hCG.

ABSTRACT

CONSTRUCTION OF A 3D CRYOGEL CO-CULTURE SYSTEM USING HUMAN PLACENTAL AND ENDOTHELIAL CELL LINES AND INVESTIGATING ITS EFFICIENCY

Merve DEMİR

Master of Biology, Department of Zoology

Supervisor: Associate Prof. Dr. Aysun KILIÇ SÜLOĞLU

January 2022, 129 pages

The placental barrier, which is formed with pregnancy, determines the maternal-fetal passage of nutrients, the transition gradient, feto-placental and utero-placental blood flow by its structure and transfer capacity. A large increase in the rates of exposure to the use of chemicals and drugs has occurred during pregnancy. Tests cannot be performed on people due to ethical restrictions. In order to complete the lack of information about the permeability of the placental barrier, the need for studies to be conducted by creating current models of the placental barrier has increased.

In this thesis, human placental choriocarcinoma cells (BeWo) and human umbilical vein cells (HUVEC) with three-dimensional (3D) environment in kriyojel prepared with different properties on mono and co-culture systems have been established. Cryogels consist of interconnected macropores that can ensure the adhesion and proliferation of cells. In the thesis study, biocompatible poly (2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA) cryogels with a 3D pore structure were supported in terms of extracellular substances (HDM) and a system closer to *in vivo* was established. Gelatin containing cryogels (PHEMAGEL) were synthesized using a PHEMA-based cryogel.

Folic acid (FA) was attached to all PHEMA and PHEMAGEL cryogels, and fibronectin (FN) or collagen type IV (KOL Type IV) joined the structure, creating an environment close to the placenta tissue. Within the scope of the characterization studies of PHEMA, PHEMA+KOL Type IV, PHEMAGEL and PHEMAGEL+FN of the 4 cryogel groups synthesized with different ingredients, swelling tests were performed and the swelling properties of the gels were evaluated. The involvement of gelatin, FA, FN and KOL Type IV in the structure of cryogels was investigated by fourier transform infrared (FTIR) spectrometer. 3D characterization analyses of cryogels were performed with micro computed tomography (Micro-CT). The pore sizes of cryogels and the adhesion potentials of the cells were examined by scanning electron microscopy (SEM). *In vitro* release analyses were performed on FA-bonded cryogels. In order to study the cytocompatibility of the synthesized cryogel groups and the proliferation abilities of the cells, they were incubated together with the cells for 2, 4 and 7 days and the viability of the cells was evaluated. Vortioxetine, an antidepressant active ingredient that doesn't have sufficient information in the literature about its use in pregnancy, was evaluated in the 3D cryogel co-culture system created. It was incubated with cells for 2, 4 and 7 days at concentrations of 30 μ M and 60 μ M. The effectiveness of MTT was examined by vitality analysis. Human chorionic gonadotropin (β -hCG) hormone production and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and protein levels were measured.

When the swelling properties of cryogels were examined, it was seen that the degree of macroscopicity was higher in PHEMA-based cryogels. A decrease in the degree of macroscopicity, degree of swelling and swelling rates have been observed due to gelatin. According to the result of the FTIR analysis, it was found that gelatin, FA, FN and KOL Type IV successfully participate in the structure of cryogels. The micro-CT result showed that cryogels have a distribution in different pore sizes. This has led to an increase in the retention and proliferation of cells. It has been observed that cryogels with fairly large pores connected with each other by SEM images have been synthesized. There was a decrease in the *in vitro* release of FA depending on the incubation period. As a result of the MTT analysis performed to understand the cytocompatibility of cryogels, it was observed that the cells are compatible with cryogels synthesized with various properties, and they do not have a toxic effect on the

cells. A decrease in cell viability was observed in mono-cultures at high doses of Vortioxetine to the 3D cryogel common culture system, but the expected decrease in cell viability at the same doses of the common culture was not observed. The amount of β -hCG hormone was measured in BeWo and common culture group, and the greatest hormone release was observed in BeWo tuesday of PHEMA+KOL Type IV. There was no significant decrease in MMP-2 and MMP-9 protein levels due to the dose administration of Vortioxetine.

In this thesis study, cryogels containing gelatin, FN and KOL Type IV in their structure were synthesized and bound with FA. Their biocompatibility with placental BeWo and HUVEC cells has been demonstrated and they have been produced on PHEMA cryogels for the first time in a common culture medium. The toxicity of the active ingredient of the antidepressant Vortioxetine used in pregnancy was evaluated with the created 3D system. The results showed that the cryogel system is biocompatible for mono- and common cultures, and in terms of cytotoxicity, doses should be higher to reduce viability in dual common culture groups compared to mono-cultures. This 3D cryogel system has shown that it can be used as a system that reflects and gives similar answers *in vivo* in areas such as new medicine, cosmetics, food toxicity.

Keywords: Placental Barrier Model, BeWo, HUVEC, Cryogel, PHEMA, Folic Acid, Fibronectin, Collagen Type IV, Vortioxetine, β -hCG.

TEŞEKKÜR

Hayallerimi gerçekleştirmem için bana fırsat veren, inanan, bu yolda beni destekleyen ve güvenini hissettiren, bilgi ve tecrübelerini sabırla ve vaktini esirgmeden her an paylaşan çok kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Aysun KILIÇ SÜLOĞLU'na,

Tez çalışmamda bilimsel bilgi ve deneyimlerini aktaran, analizlerim için laboratuvarını paylaşarak bana destek olan çok değerli Doç. Dr. Işık Perçin DEMİRÇELİK'e,

Çalışmalarım boyunca güler yüzünü eksik etmeden bilgisini ve deneyimlerini her zaman paylaşan Arş. Gör. Dr. Elif KARACAOĞLU'na,

Tez çalışmalarımda bana bilgi ve tecrübesiyle yardım eden deney ve analiz sonuçlarında her zaman bana destek olan çalışma arkadaşım Gülşen BAYRAK'a,

Zamanlarını ayırarak deney ve araştırmalarda bana yardımcı olan sevgili Bensu GÜLDAŞ ve Halil Metehan GÖKÇE'ye, laboratuvarı paylaştığım tüm arkadaşlarıma,

Çalışmalarımızı 1001-SBAG / 119S511 projesiyle finansal olarak destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na ve analizlerimin sonuçlanmasında hizmetleriyle destek sağlayan HÜNİTEK ve Jeoloji Mühendisliği Elektron Mikroskopi Laboratuvarı'na,

Bana her daim inanarak destek olan ve beni her koşulda motive ederek uzaklığı asla hissettirmeyen çok değerli arkadaşlarım Enes KESKİN ve Mehmet Akif YÜKSEL'e,

Lisansüstü eğitimim de tanıdığım ve bugüne kadar devam eden arkadaşlığıyla her zaman yanımda olan, bana bilgisini ve deneyimlerini bütün içtenliğiyle aktaran, enerjisini, güler yüzünü asla esirgemeyen ve tez yazma sürecinde desteğini fazlasıyla hissettiğim canım arkadaşım Eda Nur İNKAYA'ya,

Ankara'ya geldiğim andan itibaren bana olan güvenlerini her daim içtenlikle yansıtan, bu yolda devam etmem de beni motive ederek destek olan, bana kendimi asla yalnız hissettirmeyen değerli ailem Birsal, Oytun ve Yaman YANIKOĞLU'na,

Hayatım boyunca bana olan güvenlerini her daim hissettiren, beni koşulsuz destekleyen ve cesaretlendiren, her halime katlanarak bana anlayışla yaklaşan, varlıklarıyla bana iyi hissettiren kıymetli annem ve ağabeyime en içten teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım. Hep varolun.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Placenta Dokusu.....	3
2.1.1. Placenta Hücreleri.....	7
2.2. Endotel Hücreler ve HUVEC Hücre Hattı.....	8
2.3. Üç Boyutlu Hücre Kültür Sistemleri.....	11
2.4. Kriyojeller.....	14
2.4.1. Kriyojellerin Sentezlenmesi.....	17
2.4.2. Kriyojellerin Kullanım Alanları.....	18
2.5. Kriyojellerin Doku İskelesi Olarak Kullanılması.....	19
2.6. Poli (2-Hidroksietil Metakrilat) (PHEMA).....	23
2.7. Jelatin.....	24
2.8. Folik Asit (FA).....	26
2.9. Fibronektin (FN).....	28
2.10. Kolajen Tip IV (KOL Tip IV).....	30
2.11. Antidepresan İlaçların Gebelikte Kullanımı.....	31
2.12. Brintellix ve Etkin Maddesi Vortiksetin.....	32
2.13. Hücre Karakterizasyon Testleri.....	34
2.13.1. Sterilite Testleri.....	34
2.13.2. Üreme Eğrisi.....	36
2.14. Sitotoksikite Testleri.....	37

2.14.1. MTT Hücre Canlılık Testi.....	38
2.15. İnsan Koryonik Gonadotropin Hormonu (β -hCG).....	39
2.16. Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2).....	40
2.17. Matriks Metalloproteinaz-9 (MMP-9).....	40
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	42
3.1. Kullanılan Madde ve Malzemeler.....	42
3.2. Hücre Kültür Koşulları.....	43
3.2.1. BeWo ve HUVEC Hücrelerinin Pasajlanması.....	43
3.2.2. BeWo ve HUVEC Hücrelerinin Dondurulması ve Çözdürülmesi.....	44
3.3. Mikroplazma Testi.....	44
3.4. Hücrelerin İkilenme Zamanlarının Hesaplanması.....	46
3.5. Vortiksetin Stok Çözeltilisinin Hazırlanması.....	46
3.6. PHEMA Temelli Jelatin İçeren Süpermakrogözenekli Kriyojellerin Hazırlanması ve Folik Asit ile Birlikte Fibronektin veya Kolajen Tip IV Bağlanması	47
3.6.1. PHEMA Kriyojel Sentezi.....	47
3.6.2. Kriyojellere Folik Asit ile Birlikte Fibronektin veya Kolajen Tip IV Bağlayarak Sentezlenmesi.....	48
3.7. PHEMA Temelli Jelatin İçeren Süpermakrogözenekli ve Folik Asit ile Birlikte Fibronektin veya Kolajen Tip IV Bağlı Olan Kriyojellerin Karakterizasyon Çalışmaları.....	51
3.7.1. Şişme Testleri.....	51
3.7.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektrometresi ile Yapı Analizi.....	52
3.7.3. Mikro Bilgisayarlı Tomografi (Mikro-CT).....	52
3.8. Folik Asit (FA) Miktarının ELISA ile Ölçülmesi.....	52
3.9. Kriyojeller ile <i>In vitro</i> Hücre Kültür Çalışmaları.....	53
3.9.1. Sterilizasyon.....	53
3.9.2. Kriyojel Doku İskelesindeki Hücrelerin MTT Canlılık Analizleri.....	54
3.9.2.1. Kriyojel Doku İskelelerinde Mono ve Ortak Kültür Grupları.....	55
3.9.2.2. Kriyojel Doku İskelelerinde Mono ve Ortak Kültür Gruplarına Vortiksetin Uygulanması.....	56
3.9.2.3. MTT Canlılık Analizi.....	57

3.10. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi.....	57
3.11. β -HCG Hormon Seviyesinin ELISA ile Belirlenmesi.....	59
3.12. MMP-2 ve MMP-9 Protein Seviyelerinin ELISA ile Belirlenmesi.....	60
3.13. İstatistiksel Analizler.....	61
4. SONUÇLAR.....	63
4.1. Sterilite Testleri.....	63
4.2. Hücrelerin Üreme Eğrisi.....	63
4.3. Hücrelerin Morfolojik Görüntüleri.....	65
4.4. PHEMA Temelli Jelatin ve Protein İçeren Süpermakrogözenekli Kriyojellerin Karakterizasyon Sonuçları.....	65
4.4.1. Kriyojellerin Şişme Özellikleri.....	67
4.4.2. FTIR Analizi.....	70
4.4.3. Mikro-CT Analizi.....	73
4.5. Folik Asit Miktarının ELISA Ölçüm Sonuçları.....	78
4.6. Kriyojel Sisteminde MTT Hücre Canlılık Sonuçları	80
4.6.1. Mono ve Ortak Kültür Gruplarının Canlılık Analizleri.....	81
4.6.2. Mono ve Ortak Kültür Gruplarına Vortiooksetin Uygulamasının Canlılık Analizi.....	86
4.7. β -hCG Hormon Seviyelerinin Sonuçları	92
4.8. MMP-2 ve MMP-9 Protein Seviyelerinin Sonuçları.....	94
4.9. SEM Görüntüleri.....	97
5. TARTIŞMA.....	99
6. YORUM.....	110
7. KAYNAKLAR.....	112
ÖZGEÇMİŞ.....	129

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İnsan blastosistinin implantasyon aşamaları	4
Şekil 2.2. İnsan plasentasındaki fetal dolaşım hücreleri ve sistemi	5
Şekil 2.3. Artere ait endotel hücrelerin lokalizasyonu	9
Şekil 2.4. 3B hücre kültürü teknikleri. A. Mikro doku (sferoid) oluşumu, B. Hücrelerin doku iskelesi içerisinde oluşumu	13
Şekil 2.5. Kriyojel sentezlenmesi	18
Şekil 2.6. HEMA ve PHEMA'nın kimyasal yapısı	24
Şekil 2.7. Tip A ve tip B jelatinin elde edilmesi	25
Şekil 2.8. Folik asitin kimyasal yapısı	27
Şekil 2.9. Üç tip modülün tekrarlanan düzenlenmesiyle anahtar bağlanma bölgelerini gösteren FN proteini	29
Şekil 2.10. Vortiooksetin etken maddesinin kimyasal yapısı	34
Şekil 2.11. MTT hücre canlılık testinin şematik gösterimi	39
Şekil 3.1. A. Polimer çözeltisinin önceden soğutulmuş iki cam kolon arasına dökülmesi, B. 24 saat sonra buz kristallerinin erimesi için oda sıcaklığına çıkartılan kesilmemiş PHEMAGEL kriyojel, C. PHEMAGEL kriyojelin 9 nolu kesici ile disk şeklinde kesilmesi gösterilmiştir	48
Şekil 3.2. PHEMA (beyaz) ve PHEMAGEL (sarı) kriyojellerin kesilmiş disk görüntüsü	48
Şekil 3.3. A. Parafilm ile tabanı kaplanmış 24 gözlü hücre kültür plağı, B. Sterilizasyonu yapılan kriyojel gruplarının UV ışını altında bekletilmesi	54
Şekil 3.4. Kriyojellere ekilecek hücrelerin santrifüj sonrası hücre peletleri, B. Hücre peletinin kriyojel gruplarına ekilmesi gösterilmiştir	55
Şekil 3.5 A. Farklı özelliklerle sentezlenen 8 farklı kriyojelin sito-uyumluluk analizi için hücre kültür plaklarına yerleştirilmesi, B. Kriyojellere hücre ekimi öncesi besiyeri ile inkübasyonu gösterilmiştir ..	56
Şekil 3.6. Deneysel akış şeması	62
Şekil 4.1. BeWo hücresinin DAPI ile boyanmış çekirdeklerinin floresan mikroskop görüntüsü	63
Şekil 4.2. BeWo hücresinin üreme eğrisi grafiği	64
Şekil 4.3. HUVEC hücresinin üreme eğrisi grafiği	64

Şekil 4.4. BeWo ve HUVEC hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri. A. BeWo hücresi (200 µM ölçek), B. HUVEC hücresi (100 µM ölçek).....	65
Şekil 4.5. PHEMA temelli sentezlenen kriyojel gruplarının kesilmiş disk görüntüleri..	66
Şekil 4.6. PHEMA temelli sentezlenen kriyojellere folik asit bağlanmasıyla oluşan sekiz farklı kriyojel grubunun kesilmiş disk görüntüleri (folik asit bağlı kriyojeller sarı renkte)	66
Şekil 4.7. PHEMA temelli sentezlenen kriyojellerin şişmiş (üst sırada) ve kuru (alt sırada) görüntüleri.....	67
Şekil 4.8. PHEMA temelli kriyojellerin makrogözeneklilik dereceleri	68
Şekil 4.9. PHEMA temelli kriyojellerin jelleşme verimleri	69
Şekil 4.10. PHEMA temelli kriyojellerin şişme oranları	69
Şekil 4.11. PHEMA temelli kriyojellerin şişme dereceleri	70
Şekil 4.12. PHEMA kriyojelin FTIR/ATR spektrumu.....	71
Şekil 4.13. PHEMA+KOL Tip IV kriyojelin FTIR/ATR spektrumu	72
Şekil 4.14. PHEMAGEL kriyojelin FTIR/ATR spektrumu.....	72
Şekil 4.15. PHEMAGEL+FN kriyojelin FTIR/ATR spektrumu	73
Şekil 4.16. PHEMA kriyojelin Mikro-CT analiz sonuçlarının gözenek boyutuna göre gözenek yüzdesi dağılım grafiği	74
Şekil 4.17. PHEMA+KOL Tip IV kriyojelin Mikro-CT analiz sonuçlarının gözenek boyutuna göre gözenek yüzdesi dağılım grafiği	75
Şekil 4.18. PHEMAGEL kriyojelin Mikro-CT analiz sonuçlarının gözenek boyutuna göre gözenek yüzdesi dağılım grafiği	75
Şekil 4.19. PHEMAGEL+FN kriyojelin Mikro-CT analiz sonuçlarının gözenek boyutuna göre gözenek yüzdesi dağılım grafiği	76
Şekil 4.20. A ve A1. PHEMA, B ve B1. PHEMA+KOL Tip IV, C ve C1. PHEMAGEL, D ve D1. PHEMAGEL+FN kriyojellerin üç boyutlu Mikro-CT görüntüleri.....	77
Şekil 4.21. PHEMA temelli hazırlanmış kriyojel gruplarına bağlanan FA solüsyonlarının salım grafiği.....	78
Şekil 4.22. Kriyojel gruplarının serumlu besiyeri içerisindeki FA salım grafiği	80
Şekil 4.23. Kriyojel gruplarındaki BeWo hücresinin 2. 4. ve 7.gün canlılık yüzdeleri.....	83
Şekil 4.24. Kriyojel gruplarındaki HUVEC hücresinin 2. 4. ve 7.gün canlılık	

yüzdeleri	84
Şekil 4.25. Kriyojel gruplarındaki 3:1 hücre oranının 2. 4. ve 7.gün canlılık yüzdeleri	86
Şekil 4.26. A. PHEMA, B. PHEMA+KOL Tip IV+FA, C. PHEMAGEL, D. PHEMAGEL+FN+FA kriyojel gruplarındaki BeWo hücresine Vortiksetin uygulamasının 2. 4. ve 7.gün sonrası hücre canlılık yüzdeleri	88
Şekil 4.27. A. PHEMA, B. PHEMA+KOL Tip IV+FA, C. PHEMAGEL, D. PHEMAGEL+FN+FA kriyojel gruplarındaki HUVEC hücresine Vortiksetin uygulamasının 2. 4. ve 7.gün sonrası hücre canlılık yüzdeleri.	90
Şekil 4.28. A. PHEMA, B. PHEMA+KOL Tip IV+FA, C. PHEMAGEL, D. PHEMAGEL+FN+FA kriyojel gruplarındaki 3:1 hücre oranına Vortiksetin uygulamasının 2. 4. ve 7.gün sonrası hücre canlılık yüzdeleri.	91
Şekil 4.29. A. PHEMA ve B. PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel gruplarında BeWo, C. PHEMA ve D. PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel gruplarına ise 3:1 ortak kültür grubunun 2. 4. ve 7. gün Vortiksetin uygulaması sonrası β -hCG hormon seviyelerinin ölçümü.	93
Şekil 4.30. A. PHEMA ve B. PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel gruplarında BeWo, C. PHEMA ve D. PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel gruplarına ise 3:1 ortak kültür grubunun 2. 4. ve 7. gün Vortiksetin uygulaması sonrası MMP-2 protein seviyelerinin ölçümü.	95
Şekil 4.31. A. PHEMA ve B. PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel gruplarında BeWo, C. PHEMA ve D. PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel gruplarına ise 3:1 ortak kültür grubunun 2. 4. ve 7. gün Vortiksetin uygulaması sonrası MMP-9 protein seviyelerinin ölçümü.	96
Şekil 4.32. PHEMA kriyojelin A. hücreli ve A1. hücreli 7 gün için SEM görüntüleri; A) 500 X, bar 100 μ m, A1) 282 X, bar 20 μ m ( 3:1 (3 BeWo, 1 HUVEC) ortak kültür hücreleri)	97
Şekil 4.33. PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojelin B. hücreli ve B1. hücreli 7 gün için SEM görüntüleri; B) 500 X, bar 100 μ m, B1) 446 X, bar 20 μ m ( 3:1 (3 BeWo, 1 HUVEC) ortak kültür hücreleri).	98

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Doku iskelesi hazırlanmasında kullanılan doğal ve sentetik polimerler.....	22
Çizelge 3.1. Tez kapsamında sentezlenen kriyojel gruplarının içerikleri	50
Çizelge 3.2. Vortiksetin uygulaması için belirlenen kriyojel grupları	57



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	Santigrat derece
IC ₅₀	İnhibisyon konsantrasyonu
kDa	Kilo Dalton
kb	Kilobaz
µm	Mikro molar
µl	Mikro litre
µg	Mikro gram
M	Molar
m _t	Polimer çözeltisindeki monomerlerin toplam kütlesi
m _{ıslak jel}	Islak kriyojel ağırlığı
m _{şışmış jel}	Şişme oranına ulaşmış kriyojel ağırlığı
m _{sıkılmış jel}	Sıkılmış kriyojel ağırlığı
(v/v)	Hacim/Hacim Oranı

Kısaltmalar

2B	İki Boyutlu
3B	Üç Boyutlu
5-HT	Serotonin
APS	Amonyum Per Sülfat
BeWo	İnsan plasenta koryokarsinom hücreleri
β-hCG	İnsan Koryonik Gonadotropin
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol
DMEM F-12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Ham's F-12
DMSO	Dimetil Sülfoksit

EDTA	Etilendiaminotetraasetik asit
ELISA	Enzime Bağlı İmmünosorbent Analizleri
FA	Folik asit
FN	Fibronektin
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi
FSS	Fötal Sığır Serum
HDM	Hücre Dışı Maddeler
HEMA	2-hidroksietil metakrilat
HUVEC	İnsan göbek kordonu ven hücreleri
HMDS	Hekzametildisilazan
KOL Tip IV	Kolajen Tip IV
Mikro-CT	Mikro Bilgisayarlı Tomografi
MMP-2	Matriks Metalloproteinaz-2
MMP-9	Matriks Metalloproteinaz-9
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SSRI	Serotonin Geri Alım İnhibitörü
PHEMA	Poli (2-hidroksietil metakrilat)
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PEGDA	Poli Etilen Glikol Diakrilat
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilen Diamin

1. GİRİŞ

Anne ile bebek arasındaki besin geçişi, kan akışı, fetüsün atık maddeleri uzaklaştırabilmesi gebelik ile birlikte oluşan plasenta organıyla sağlanmaktadır. Gebelik döneminde hormonal ve sosyal yaşamdaki değişiklikler daha fazla olduğundan gebe bireylerde psikiyatrik rahatsızlıkların görülme oranı artmaktadır. Bu oran % 12-36 arasında değişmektedir ve yaklaşık % 8-10'una gebelik döneminde antidepresan ilaçlar reçete edilmektedir [1, 2]. Gebelik boyunca değişen plasenta yapısı ve fonksiyonları ilacın fetüse geçiş oranını etkileyebilmektedir [3]. Gebelikte kullanılan bu ilaçların plasentadan geçiş durumları, fetüse aktarılması ve bunlara bağlı olarak embriyonik gelişim üzerindeki etkilerine dikkat edilmesi gerekmektedir. Kullanılan ilaçların değerlendirilmesi ve güvenilirliği, *in vitro* çalışmalar ve ardından deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar ile değerlendirilmektedir. İnsanlar üzerinde ise etik kısıtlamalardan dolayı çalışmalar yapılamadığından *ex-vivo* ya da gözlemsel çalışmalar yapılarak ilaçlar hakkındaki riskler açığa çıkartılabilmektedir [4]. Fetal gelişimi anlayabilmek için plasenta üzerinde çalışmalar yapılması gerekmektedir. Plasentanın laboratuvar ortamında çeşitli yöntemler (*in vivo* hayvan modelleri, *in vitro* çalışmalar) ile çalışılmasıyla yapısı, fizyolojisi ve bariyer özellikleri anlaşılabilmektedir. Ancak *in vitro* ortamda oluşturulmuş ve kabul görmüş bir plasenta modeline literatürde rastlanmamıştır. Plasental hücrelerin kullanıldığı *in vivo*yu en yakın temsil edebilecek yeni bir plasenta modelinin oluşturulmasıyla ilaçların, kimyasal maddelerin, kozmetiklerin vb. ksenobiyotiklerin toksisitesi değerlendirilebilecektir.

Günümüzdeki *in vitro* çalışmalar, *in vivo* ortamı daha yakın temsil edebilen üç boyutlu (3B) hücre kültürüne yönelmektedir. Hücrelerin, 3B hücre kültüründe hücre-hücre veya hücre-hücre dışı matriks etkileşimleri, hormon üretimi gibi hücrelerin gelişiminin çok yönlü olmasından dolayı çok katmanlı doku benzeri yapılar oluşturulmaktadır. 3B hücre kültürleri, iki boyutlu (2B) hücre kültürlerine kıyasla *in vivo*ya daha iyi benzerlik göstermesinden dolayı tercih edilmektedirler. Plasenta dokusunun çeşitli hücre katmalarından meydana gelmesi 3B hücre kültüründe ortak kültür çalışmalarına imkan sağlamaktadır. Bu çalışmada, insan plasental trofoblast hücresine (BeWo) destekleyici olması amacıyla plasental gelişimde önemli rol oynayan fetal endotel hücresi olan insan göbek kordunu veni makrovasküler hücresi (HUVEC) ile birlikte kullanılarak 3B ortamda kriyojel iskelesi üzerinde ortak-kültür sistemi oluşturulmuştur. Kriyojel doku iskelesine fibronektin, kolajen tip IV ve folik asit bağlanarak plasental HDM'yi

yansıtacak üç boyutlu bir yapı oluşturulmuştur ve hücrelerin daha iyi tutunabileceği ve proliferere olabileceği bir ortam sağlanmıştır.

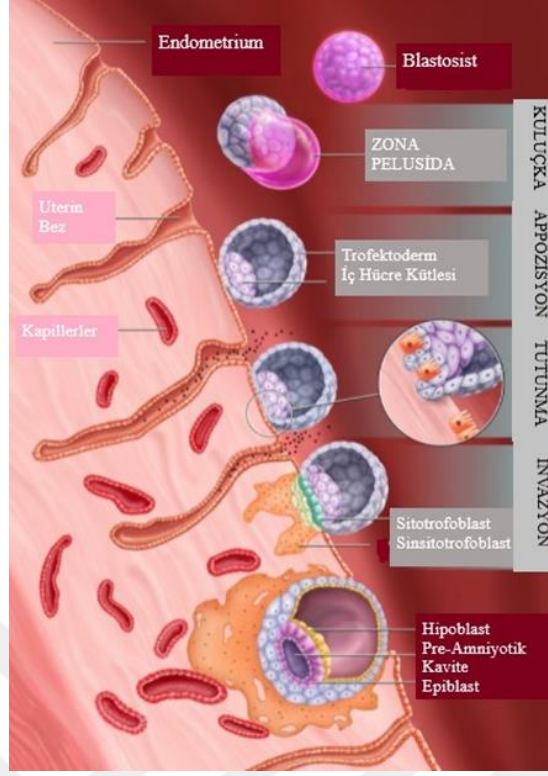
Antidepresan ilaçlar enzim veya reseptör inhibitörleri ya da geri alım engelleyicileri olarak etki etmektedirler. Bir serotonin geri alım inhibitörü (SSRI) olan Brintelliks antidepresan ilacının etken maddesi olan Vortiksetin sisteme uygulanarak oluşturulan 3B plasental kriyojel ortak kültür sistemine etkisi incelenmiştir. Tez çalışması kapsamında farklı özelliklere sahip kriyojeller sentezlenerek hücrelerin mono ve ortak kültürleri kriyojeller üzerinde modellenmiştir ve etkinlikleri araştırılmıştır. Hücrelerin sentezlenen kriyojellere verdiği yanıt karşılaştırılmış ve uygun kriyojel modelleri ile devam edilerek Vortiksetin maruziyeti incelenmiştir. 3B hücre kültür çalışmasında BeWo ve HUVEC'lerin ortak kültürü ile ilk kez kriyojel iskelesinde plasental modelin oluşturulması tezin özgün kısmını oluşturmaktadır. Oluşturulan plasmanta modelinin literatürdeki eksikliklere katkı sağlaması beklenmektedir.

Tez çalışması kapsamında PHEMA kriyojelin yapısına HDM bileşenleri olarak jelatin ve FN eklenmesi ve oluşturulan farklı özellikteki kriyojellere folik asit bağlanarak deneylerin gerçekleştirilmesi planlanmıştır. Yapılan ön çalışmalar sonucunda yüksek canlılık veren PHEMAGEL+FN+FA kriyojel grupları ile deneylere devam edilmesine karar verilmiştir. İmplantasyon aşamasında trofoblast hücrelerinin endometriuma tutunmasında plasental kolajen tip IV'ün önemli katkısı olduğu bilinmektedir. Dokunun yapısal bütünlüğünü sağlayan HDM bileşenlerinden kolajenin PHEMA kriyojele eklenmesi *in vivo* yapıya benzerlik açısından anlam taşımaktadır [5]. PHEMAGEL+FN+FA kriyojel gruplarına ek olarak PHEMA+KOL tip IV+FA kriyojel grupları da hazırlanmış ve en uygun plasmanta modelinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

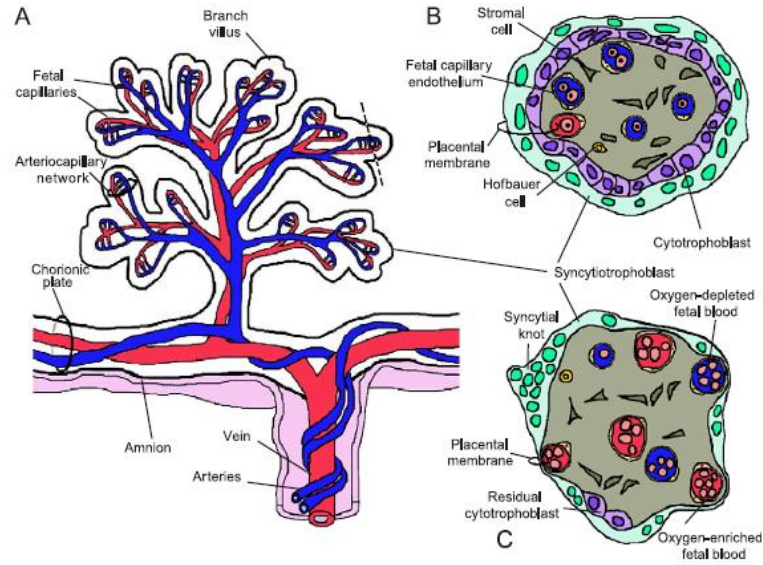
2.1. Plasenta Dokusu

Plasenta gebelik ile başlayan ve gebeliğin sonuna kadar değişimler yaşayan geçici bir organdır. Türler arasında gelişiminde farklılıklar gösteren dokunun ana işlevi tüm canlılarda ortaktır. Maternal ve fetal arasında kan damarları aracılığıyla gebelik boyunca alışveriş sağlayan bir dokudur. Gebeliğin sonuna kadar oksijen ve besin alışverişini, fetüsün atık maddelerinin uzaklaştırılmasını, antikör geçişini ve hormon üretimi sağlayan seçici geçirgen özelliğine sahip bir bariyer olarak görev yapmaktadır. Gebelik, ovulasyon ile oosit-2'nin fallop tüpüne geçmesi ve sperm ile karşılaşarak döllenmenin gerçekleşmesiyle başlamaktadır. Fertilizasyon sonrası mayoz bölünmesini tamamlayan oosit-2, sperm çekirdeği ile kaynaşarak diploid (2n) kromozoma sahip zigotu oluşturmaktadır. Zigot, uterusu doğru ilerlerken segmentasyon başlamaktadır. 2-3 gün sonra embriyo 16 hücreden (blastosist) oluşan bir küre şeklinde uterusu ulaşır ve burada bölünmeye devam eder. Uterusta endometriyum salgılarıyla beslenen hücre topluluğu yaklaşık 5 gün içinde blastosist haline gelmektedir. Bu embriyonik evrede uterustaki sıvı blastosistin etrafındaki zona pellusidayı aşarak blastosöl adı verilen bir boşluk oluşturmaktadır. Bu hücreler asimetrik bölünerek iki farklı hücre popülasyonunu oluştururlar. Bunlar fetal yapılarını oluşturacak iç hücre kütlesi ve plasentaya dönüşecek olan ekstra embriyonik hücrelerin dış tabakası trofektodermden (trofoblast hücreleri, TE) meydana gelmektedir. Zona pellusidan ayrılan trofoblast hücreleri endometriyuma ilk temasını gerçekleştirerek implantasyon için endometriuma tutunmayı gerçekleştirirler. Tutunmanın başarılı bir şekilde sağlanmasıyla endometriyum epiteli açılır ve trofoblast hücrelerinin geçmesi sağlanır. Trofoblast hücreleri istilacı bir şekilde apoptoz veya nekroza neden olmadan desidual dokusu içine yerleşmeye başlar. Bu aşamada trofoblast hücreleri çoğalmaya devam eder ve farklılaşır. İmplantasyonun ilerleyen günlerinde blastosist endometriyuma iyice gömülür ve uterus epiteli invaziv bölge üzerinden yeniden oluşur. İmplantasyon bölgesindeki sinsityotrofoblast kitlenin içerisinde sıvı dolu vakuoller (lakuna) oluşmaya başlamaktadır. Bu vakuoller bölünür, genişler ve birleşir. Lakuna aşaması plasentasyon aşamasının başlangıcını ifade etmektedir [6-8]. Şekil 2.1'de implantasyon aşamaları verilmiştir.



Şekil 2.1. İnsan blastosistinin implantasyon aşamaları [7].

İmplantasyondan birkaç gün sonra gebeliğin ise yaklaşık 8.gününde trofoblast hücreleri iki farklı tipte hücreye dönüşerek tabakalar oluşturur. İç tabakada sıralı ve mononükleer özellikle sitotrofoblast hücreleri oluşurken endometriyum ile bağlantılı olan blastosistin dış tabakasında ise sitotrofoblast hücrelerinin mitoz bölünmesiyle hücre sınırları belli olmayan ve polinükleer özellikteki sinsityotrofoblast hücreleri oluşmaktadır. Sinsityotrofoblast hücreleri anne dokusu ile temas halindedir ve anne ile fetüsün kan damarları arasında ara yüz olarak yer almaktadır. Sitotrofoblast hücreleri ise henüz materyal doku ile tema halinde değildir. Şekil 2.2’de plasenta hücreleri gösterilmiştir. Sitotrofoblast hücrelerinin devamlı proliferasyonu trofoblastın büyümesini sağlayan kök hücre görevi görmektedir [7, 9]. Gebeliğin başlangıcında sıralı olan sitotrofoblastlar gebelik ilerledikçe kesintili hale gelmektedirler. Başlangıçta kalın olan sinsityotrofoblast tabakası ise gebeliğin devamı ile birlikte incelmektedir. Bu durum plasenta dokusunun gebelik süresince değişimler yaşadığını ve anne ile fetüs arasındaki alışveriş miktarlarında farklılık olabileceğini göstermektedir [10].



Şekil 2.2. İnsan plasentasındaki fetal dolaşım hücreleri ve sistemi [11].

İnsan plasentası, materyal kanı ile doğrudan temas eden plasental trofoblast hücrelerinin etkileşimini ve gelişmekte olan embriyoya besin alışverişini sağlayan hemokorial villöz tipte bir organdır [12]. Utero-plasental birim koryonik plakadan oluşan fetal dokudan ve bazal plakadan oluşan maternal dokudan oluşmaktadır. Koryonik plaka fetal kan damarlarını içerir ve amniyon ile kaplanmaktadır. Bazal plakada ise fetal ekstrasvillöz trofoblastları, desidua stroma hücreleri, makrofajlar, doğal öldürücü hücreler ve diğer bağışıklık hücreleri olmak üzere uterus desidua hücrelerini içermektedir [9, 11]. Plasentanın ana birimleri koryonik ve bazal plaka arasında yer alır ve dallanmış, fetal kan damarlarını içeren sıkı bir şekilde varolan villöz yapılarını içeren intervillöz boşluklar bulunmaktadır. Maternal ve fetal değişimlerin çoğu koryonik villusların terminal bölgelerinde gerçekleşmektedir. Bu intervillöz boşluklar sinsityotrofoblast hücreleri ile tamamen kaplanmaktadır [11]. İnsan plasentası koryoallontoik tip plasenta olarak bilinmektedir. Plasenta ile fetüse temiz kan taşınması allantois kesesindeki arteria umbilicalis damarları tarafından sağlanmaktadır. Fetüsten kirli kanın uzaklaştırılmasını ise vena umbilicalis damarı gerçekleştirmektedir. İki arter ve bir ven damarı içeren göbek kordonu madde alışverişinin gerçekleşmesine yardımcı olmaktadır [13]. Gebelik ile birlikte oluşan plasenta ve fetüs gelişimi için vaskülogenez ve anjiyogenez süreçleri çok önemlidir. Vaskülogenez ilk kan damarlarının oluşumunu sağlayan bir olaydır. Sonrasında ise var olan kan damarlarından yeni dallanmaların baskın olduğu anjiyogenez olayı gelmektedir. Bu iki olay birbirini takip etmektedir [11]. Damarların sorunsuz bir şekilde oluşumu fetüs ve plasenta gelişimi açısından önem taşımaktadır.

İnsan plasentasının temel işlevlerinden bir diğeri de gebeliğin devamlılığı için önemli olan hormonların salgılanmasını gerçekleştirmesidir. Trofoblast hücreleri tarafından sağlanan hormon üretimleri gebeliğin başlaması ve devam etmesi, plasentanın oluşumu ve fetal gelişim için farklı roller oynadıkları için hormon salgılanmasının devamlılığı önemlidir. İnsan koryonik gonadotropin (hCG), progesteron ve östrojenler gibi plasental hormonlarıdır. hCG gebelik için endometrium ve plasental anjiyogenez için düzenleyici olarak rol oynamaktadır. Gebeliğin devam etmesini sağlayan progesteron hormonu hamileliğin ilk haftalarında korpus luteumdan salgılanmaktadır. Ancak gebeliğin devamıyla birlikte yaklaşık 6-8.haftalardan sonra plasenta progesteron hormonunu salgılayan ana organ olarak görev yapmaya başlamaktadır [11, 13].

Plasentanın temel işlevleri alışveriş, metabolizma ve endokrin cevap olarak sınıflandırılabilir. Fetüse oksijen, su, vitamin, mineral, karbonhidrat ve diğer besin maddeleri taşıırken diğer yandan fetüsten oluşan atık maddeleri uzaklaştırmaktır. Maddeleri metabolize ederek maternal ve fetal dolaşıma bırakabilir. Plasenta seçici geçirgen bir bariyer olarak görev yapıyor olsa da bazı ilaç ve metabolitleri, çeşitli ksenobiyotikler pasif difüzyon ile bariyeri aşarak embriyoya ulaşabilmektedir [6, 11]. Pasif difüzyona ek olarak bazı ilaçların, antikorların, besinlerin ve ksenobiyotiklerin plasentadan taşınması protein aracılı taşıma ve aktif taşıma yolu ile de gerçekleşmektedir. Taşıma mekanizmaları plasenta ve fetal maruziyete yol açabilecek bazı substratların geçişine de neden olabilmektedirler. Zar taşıma proteini çözünen taşıyıcıları (SLC22A5) fetüsün gelişimi için ihtiyaç duyulan folik asit, laktat, L-arginin, vitaminler ve yağ asitleri gibi temel besinlerin taşınmasını sağlamaktadırlar. Bu taşıyıcı proteinler gebelikte sık kullanılan antibiyotik ve antidepresan gibi ilaçların da plasentadan geçişine neden olabilmektedirler. Çözünen taşıyıcı proteinlerine (SLC) ek olarak ATP bağlayıcı kaset (ABC) ailesi de insan plasentasında bulunan ana taşıyıcıdır. Sinsityotrofoblast hücreler plasental transportu düzenlemektedir. ABC taşıyıcı ailesi bu hücrelerin yüzeyinde ifade edilmektedir. ABC taşıyıcıları, ilaç ve ksenobiyotikleri fetal dolaşımdan uzaklaştırarak fetal gelişimi korumaya yöneliktir. İlaçların farmakokinetiği ABC ailesi tarafından düzenlenmektedir. Endojen ve eksojen substratlar arasındaki taşınma hızı, miktarı ve rekabeti temel ve gerekli olan besinler ile yer değiştirebilir ve bu durum fetüse zararlı olan ilaçların, ksenobiyotiklerin geçişine neden olabilmektedir [14]. Plasenta, gebelik boyunca fetal gelişim için bir önemli organdır. Dokuda meydana gelebilecek herhangi bir hasar veya bozukluk fetal gelişimi olumsuz yönde etkileyebilir.

Gebelikte kullanılan ilaçlar doğrudan veya dolaylı yoldan fetüsü etkileyebilmektedir. İlaçlar doğrudan plasenta aracılığıyla fetüse taşınabileceği gibi plasenta dokusunun yapısını, fizyolojisini ve metabolizmasını değiştirerek fetüsü dolaylı yoldan etkileyebilmektedir. Plasenta gebelik boyunca değişime uğrayan bir doku olduğundan maruz kalınan ilaçların ve ksenobiyotiklerin hangi dönemde alındığı, metabolize edildiği ve dağılım gösterdiği gibi durumlar fetüsün gelişimi açısından önem taşımaktadır. Plasenta işlevindeki değişimler ilaçların fetüsü geçme oranını etkileyebilmektedir.

2.1.1. Plasenta Hücreleri

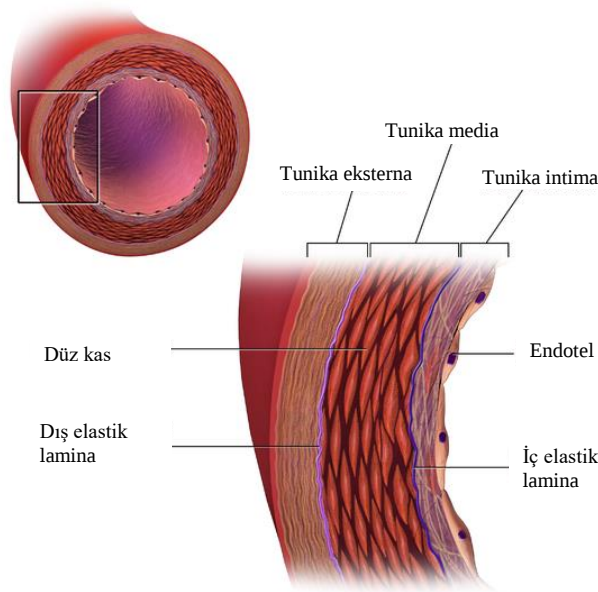
Plasenta dokusu üzerinde yapılacak araştırmalar için *in vitro* tekniklerin olduğu çeşitli stratejiler tercih edilmektedir. Perfüze plasenta dokuları, primer sitotrofoblast hücreler ve ölümsüzleştirilmiş hücre hatları olmak üzere üç farklı teknik kullanılmaktadır [15]. Doğum sonrası plasenta dokularını bağışlayan kadınlardan alınan plasenta uygun yöntemlerle perfüze edilmektedir. Perfüzyon yönteminde maternal ve fetal kan damarları bir arada bulunmaktadır ve fizyolojik analizler için uygun bir modeldir. Ancak *ex vivo* plasental perfüzyon gebeliğin erken evrelerinde maruz kalınan ilaç veya ksenobiyotiklerin bilgisini verememektedir. Gebelik boyunca değişen plasenta dokusunun son trimesterini yansıtan perfüzyon örnekleri çalışmalar için yeterli bilgileri yansıtmamaktadır. Ayrıca doku canlılığının korunmasındaki teknik sınırlamalar perfüzyon yönteminin kullanılmasını kısıtlamaktadır [14, 16]. Bu faktörler değerlendirildiğinde perfüze plasenta modellerinin kullanılmasının dezavantajlara sebep olduğu ve çalışmalar için deneysel verilerin güvenilir olmayacağı düşünülmektedir [14]. Plasenta dokusunun ana işlevlerini trofoblast hücreleri gerçekleştirmektedir [17]. *In vitro* uygulamalar için primer sitotrofoblast hücrelerin kültürü kullanılmaktadır. Primer sitotrofoblastlar kültüre edildiklerinde trofoblast hücre özelliklerini korumalarından dolayı hormon üretimi gerçekleştirirler. *In vitro* sitotoksitesisi analizlerinde kullanılan primer hücreler fizyolojik olarak uygun olarak görünseler de sınırlı özelliklerinden dolayı hücreler arası geniş boşluklar bırakırlar ve tek tabaka halinde üreyemezler. Tek tabakayı oluşturmamalarından dolayı transfer çalışmalarında kullanımları sınırlandırılır. Primer kültürlerin sınırlı büyüme potansiyellerinden dolayı devamlılığı olan çalışmalar yapılamamaktadır. Ayrıca plasentadaki çok sayıda ve tipteki hücrelerden dolayı primer sitotrofoblast hücrelerini izole etmek zorlaşmaktadır

[14]. Perfüze plasenta dokularına ve primer sitotrofoblast hücrelerine kıyasla ölümsüzleştirilmiş hücre hatları kullanılarak yapılan plasental çalışmalar daha büyük avantajlar sağlamaktadır. İnsan koryokarsinomundan türetilen JEG-3, JAr ve BeWo hücre hatlarının morfoloji ve biyokimya özelliklerinin normal trofoblast hücreleriyle karşılaştırılması için çalışmalar yapılmaktadır. Gebelik sonrası yoğun oranda gonadotropin hormonu sentezlemesi plasenta dokusunda malignant tümör ile karakterize edilebilmektedir. İncelemeler sonrasında tümörün farklılaşmamış sitotrofoblast hücreleri olduğu belirlenmiştir. Sitotrofoblast hücrelerin ölümsüzleştirilerek *in vitro* koşullarda kültüre edilmesi plasenta üzerine yapılan çalışmalar açısından önemli olmaktadır. BeWo hücrelerinin, sitotrofoblastları en iyi şekilde temsil etmesi ve kültüre edildiklerinde tek tabaka oluşturması çalışmalarda yaygın olarak kullanılmasını sağlamaktadır [14]. BeWo hücreleri, sitotrofoblast hücrelerinin ana işlevi olan hCG, progesteron, östrojenler gibi plasental hormonları salgılamaktadır. BeWo hücreleri keratini ifade etmektedirler [13, 16]. Sitotrofoblast özellikte olan BeWo hücreleri *in vitro* koşullarda forskolin maddesinin uygulanmasıyla sinsityotrofoblast hücrelere dönüştürülmektedir [14]. Gebeliğin ilk trimesterindeki sitotrofoblast hücrelerin özelliklerini yansıtan BeWo hücreleri olgunlaştırılarak son trimesterindeki sinsityotrofoblastların özelliklerini gösterir. BeWo hücresi ile gebeliğin ilk ve son trimesterlerinde yer alan hücrelerin özellikleri bir hücre hattı ile sağlanmış olmaktadır. Bu durum BeWo hücresinin plasenta uygulamalarında kullanılmasını arttırmaktadır [18].

2.2. Endotel Hücreler ve HUVEC Hücre Hattı

Endotel hücreleri tunika intimanın lümene yakın bölgesinde tek sıra halinde bulunarak damarları içten kaplamaktadır. Endotel hücrelerin alt kısımlarında kendi sentezledikleri bazal lamina bulunur ve hücreler bazal laminaya tutunurlar. Şekil 2.3’de endotel hücrelerin bulunduğu lokalizasyon verilmiştir. Endotel hücreleri, mezenşimal hücrelerden farklılaşan anjiyoblastlardan gelişmektedirler. Dışarıdan gelen sinyalleri membranlarında veya sitoplazmalarında bulunan reseptörler aracılığıyla alırlar ve aktif moleküllerin, besin maddelerinin ve kan hücrelerinin akışını seçici bir bariyer görevi gibi düzenlemektedirler [19]. Endotel hücreleri izole edildikleri dokulara özgü şekil ve işlevsellik göstermektedirler. Farklı dokulardan izole edilen endotel hücreleri yüzey fenotipi ve protein ifadesi açısından farklıdırlar.

Endotel hücreleri bulundukları dokuya göre sürekli, kesintisiz ve aralıklı kapiller özelliği göstermektedir [19] [20]. Hücre bağlantılarının sıkı olduğu ve küçük moleküllerin, besinlerin ve çözünmüş maddelerin geçişinin pinositotik veziküller ile seçici geçirgen bir bariyer olarak az miktarda sağlanması sürekli kapiller (kesintisiz) sisteminin olduğunu göstermektedir [19]. Plasenta dokusu sürekli kapiller sistemine sahiptir [8]. Endotel hücrelerin yapısı ve bütünlüğü, damar duvarının ve dolaşım işlevinin korunmasında önemli bir parametredir. Ayrıca lenfosit ve lökositlerin hareketlerini düzenleyerek immün ve inflamatuvar süreçlerde görev alırlar [21]. Endotel hücrelere özgü olan belirteçler trombosit yapışma molekülü (CD31), vasküler endotelyal kaderin (CD144), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) reseptörleri ve von Willebrand faktörü (vWF)'dür [22]. Kanın pıhtılaşmasına yardımcı olan vWF'ler endotel hücrelerin sitoplazmasında 0,1 μm eninde ve 0,3 μm boyunda olan Weibel-Palade granülleri içerisinde yer almaktadırlar [19]. Bu belirteçler endotel hücrelerine özgüdür. CD144, hücrelerle sıkı bağlantılar oluşturarak hücresel bütünlüğü sağlar ve anjiyogenez için gereklidir. CD31, anjiyogenez düzenlenmesinde ve hücreler arası bağlantılara katkı sağlamada yer almaktadır. VEGF reseptörleri, ligandları tarafından aktive edilir ve hücre çoğalmasını, göçünü organize ederek vaskülogenez ve anjiyogeneze katkı sağlamaktadır [22].



Şekil 2.3. Artere ait endotel hücrelerin lokalizasyonu [23].

Endotel hücrelerinin ana işlevlerinden biri kan ile doku arasında çift yönlü geçirgen bir bariyer olarak yer almasıdır. Fonksiyonel olan bu bariyer büyük ve küçük moleküllerin, besinlerin geçişini kontrol etmektedir. Bu hücreler aktiftir ve parakrin ve endokrin etkiler göstererek çeşitli metabolik işlevlerde rol oynamaktadır [21, 22]. Endotel hücreleri doku travması esnasında hasar görmüş olan damarlar için trombositlerle birlikte kanamayı durdurmaya yönelik pıhtılaşma süreçlerini başlatmaktadırlar. Endotel hücrelerin sitoplazmalarında bulunan Weibel-Palade granülleri içerisindeki von Willebrand faktörleri kan kaybını azaltacak trombin oluşumunu sağlarlar. Sağlıklı damar yapısında ise trombosit yapışmasını engellerler ve antitrombotik bir işlev sağlayarak pıhtılaşmayı önlemektedirler. Böylece kan akışını kolaylaştırmış olurlar [19] [20]. Özetlenecek olursa, endotel hücreler yaralanmanın olduğu durumlarda pıhtılaşmayı sağlayarak kanamayı durdurur ve sağlıklı hücrelerde ise pıhtılaşmayı engelleyerek homeostazi korumaktadır. Endotel hücrelerin başka bir görevi ise kan damarlarının daralmasında (vazodilatasyon) ve genişlemesinde (vazokonstriksiyon) meydana gelen değişiklikleri yani kan basıncını kontrol edebilmek için çeşitli maddeler salgılamaktır. Vazodilatör etki için prostosiklin (prostaglandin-I₂) ve nitrik oksit (NO) salgılayarak damar çapında daralmayı, vazokonstrüktör etki için ise endotelin-1 ve trombosit aktive edici faktör (PAF) salgılayarak damar çapında genişlemeyi sağlamaktadır. Endotelin-1 en kuvvetli vazokonstrüktör madde olarak bilinmektedir [19, 24].

Endotel hücreleri, hücre-hücre adezyon ilişkileriyle vaskülogenez ve anjiyogenez işlevlerinin meydana gelmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Vaskülogenez ve anjiyogenez insan plasentasının kan damarı oluşumunda birbirini takip eden olaylardır [25]. Vaskülogenez damar oluşumunun ilk basamağıdır ve embriyoda anjiyoblastlar, endotel hücrelerine farklılaştıktan sonra öncü bir kılcal ağ oluşturmak üzere kaynaştığında meydana gelmektedir [21]. Anjiyogenez ise var olan damarlardan yeni damarların oluşturulmasını temsil etmektedir [25]. Vaskülogenezin en erken evrelerinde VEGF ve endotel hücreye özgü reseptörler (VEGFR-1, VEGFR-2) gereklidir. Ayrıca anjiyopoietin-1 ve anjiyopoietin-2 endotel hücrelerin çoğalmasını, göçünü, olgunlaşmasını ve vasküler geçirgenliği artırarak anjiyogenez için endotel hücrelerin korunmasını sağlamaktadırlar. Anjiyogenez, plasentada kan damarlarının ve embriyo gelişimi için önemli bir süreçtir. Eksikliğinde embriyoda malformasyonlar ya da erken ölümler görülebilir [21, 22].

Endotel hücreleri organizmanın çeşitli bölgelerinde yer alan kan damarlarından izole edilebilmektedirler. Kan damarlarını temsil eden endotel hücreler biyomedikal uygulamalarında sıklıkla tercih edilmektedirler. Kullanılacak endotel hücre türü çalışılacak dokuya özgü olarak seçilmektedir. HUVEC *in vivo* endotel hücrelerini en iyi şekilde taklit ettikleri için çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedirler. Endotel hücre özelliklerini taşıyan HUVEC'lerin elde edilmesi kolay ve ucuzdur. *İn vitro* çalışmalara uyum göstererek proliferasyon yeteneklerini korurlar ve kolay pasajlanırlar [19, 22]. Vasküler endotelin fiziksel özelliklerini temsil eden ve pasajlamadan sonra karakteristik özelliklerini koruyan HUVEC'ler *in vitro* modeller oluşturmak için kullanılmaktadır. Endotel hasar ve onarımında, apoptoz, preeklampsi, kanser, ateroskleroz, pıhtılaşma, doku mühendisliğinde biyomateryaller ve rejeneratif tıp gibi çeşitli biyolojik süreçlerin ve hastalıkların incelemesinde kullanılırlar [26].

HUVEC hücreleri, vasküler endotel hücre özelliklerinin ve biyobelirteçlerinin çoğunu taşımaktadırlar. Bu hücreler besinlerin, çözünen maddelerin ve elektrolitlerin geçişinde seçici bir bariyer olarak görev almaktadır. Plasenta dokusunun bariyer özelliğine destek olmaktadır. Ayrıca HUVEC hücreleri kılcal damar ağı oluşumunda veya tübüler morfojeniz sürecindeki yapışma moleküllerinin incelenmesinde de kullanılmaktadır. HUVEC hücresi belirteçlerinden trombosit endotel hücre yapışma molekülü (PECAM-1, CD31) hücre-hücre ve hücre-lökosit düzenlemesini sağlar, endotel işareti olarak bilenen CD144 (VE-kaderin) vasküler oluşumda yer alır ve HUVEC homojenliğini garantiler. vWF'yi, vasküler endotelyal büyüme faktörünü (VEGF), büyüme faktörleri için reseptörleri, vazoaaktif ligandları, anjiyotensin II ve transforme edici büyüme faktörü- β gibi endotel hücresinin çoğu özelliklerini taşımaktadır [26].

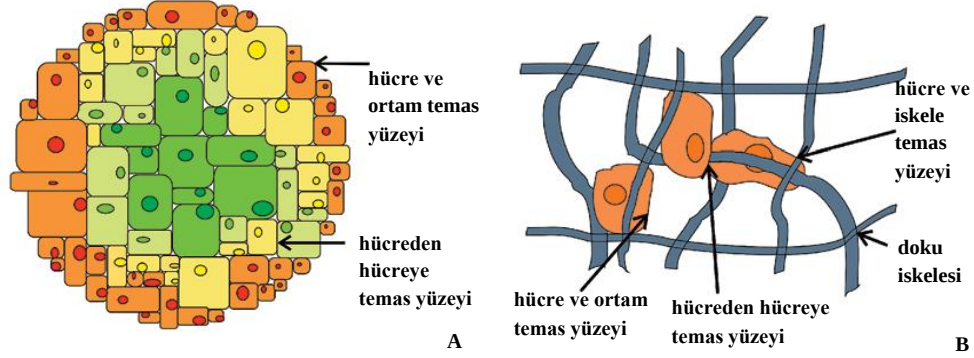
2.3. Üç Boyutlu Hücre Kültür Sistemleri

İn vitro hücre kültürleri, hücre davranışlarının anlaşılmasını sağlamak için sıklıkla kullanılmaktadır. Hücre büyümesi, göçü, farklılaşması ve ölümü gibi fizyolojik süreçleri içermektedir. Doku veya organlardan izole edilerek kültürlen hücrelerin davranışlarının incelenmesi *in vivo* süreçlerin anlaşılması için önem taşımaktadır [27]. Hücre kültürleri, hücre biyolojisinin anlaşılmasını sağlamakla birlikte hastalık mekanizmalarının anlaşılmasında da büyük öneme sahiptir.

İlaç etkinliği, protein üretimi, doku morfolojisi, toksisite ve kanser çalışmaları gibi farklı alanlarda *in vitro* bir araç olarak hücre kültürleri tercih edilmektedir [28]. İki boyutlu (2B) hücre kültürü hücresel tepkileri incelemek için sıklıkla kullanılmaktadır. 2B hücre kültürü, doku veya organlardan izole edilen hücrelerin düz plastik, sert bir zemin üzerinde büyütülmesine dayanmaktadır. Kültür ortamı atıkların uzaklaştırılması ve taze besin sağlamak için sık sık değiştirilmektedir [29]. 2B kültürlerinin, hücre-hücre ve hücre-hücre dışı matriks (HDM) arasındaki etkileşimlerinin bozulması, bölünme ve çoğalma yöntemleri, hücre morfolojisindeki değişikliklerinden dolayı *in vivo* yanıtı eksik yansıtmakta bu nedenle de bazı kullanım alanlarında sınırlamalar bulunmaktadır. Bu sınırlamalardan dolayı *in vivo* ortamı en iyi şekilde yansıtabilecek ve 2B hücre kültürü ile hayvan çalışmaları arasındaki boşluğu doldurabilecek üç boyutlu (3B) hücre kültür sistemleri geliştirilmektedir. 3B hücre kültürü ile hücrelerin birbirleriyle etkileşimi ve HDM'nin artmasıyla hücre çoğalması, farklılaşması, tepkilere yanıtları ve hayatta kalma süreleri olumlu yönde etkiler göstermektedir [27, 28].

3B hücre kültürleri, hücre-hücre ve hücre-HDM etkileşimleriyle çevresel nişler oluşturmaktadır. Hücreler bulundukları ortamda metabolik işbirliği göstererek uygun bir mikro ortam, çoğalma, farklılaşma, göç ve uzun süre kültüre adapte olabilme gibi biyokimyasal ve biyomekanik özellikleri ile *in vivo* koşullara benzer yanıtlar göstermektedirler. 3B hücre kültürlerinin *in vivo* sistemlere benzerliği sayesinde bilimsel verilerin güvenilirliği artmakta ve araştırma alanları en fazla tercih edilen hücre tekniği olmaktadır. 3B hücre kültür sistemleri; canlı dokularda bulunan doğal ortamın ve hücrelerin birbirleriyle etkileşimleri sonucu oluşturduğu HDM'yi taklit edebilen sistemlerdir. Doku iskelesi kullanılarak ve iskele kullanılmadan hücrelerin bir araya gelerek mikro dokular oluşturmaları araştırmalarda tercih edilen 3B kültür sistemi modelleridir. Hücrelere mekanik olarak destek sağlayarak doku bütünlüğünün korunmasını sağlayan HDM bileşenlerini içeren iskeleler 3B kültür çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedirler. Kemik, kıkırdak gibi sert dokuların hücresel incelemelerinde ve uzun süreli kültür ortamı ile doku oluşumunun sağlanması için uygun modeller olmaktadır. 3B hücre kültürlerinde iyi oluşturulmuş mikro ortam, hücreleri mekanik ve yapısal olarak destekleyerek çoğalma, göç, farklılaşma, matriks üretimi gibi işlevlerini kolaylaştırmaktadır ve ilaç keşifleri, sitotoksisite, hücre büyümesi, kanser çalışmaları, gen ve protein ekspresyon çalışmalarında 3B hücre kültür sistemleri sıklıkla tercih edilmektedir [27, 30].

Hücrelerin agar içinde iskelesiz 3B ortamda bir araya gelerek oluşturdukları mikro doku ve bir doku iskelesine bağlı olarak üretilmeleri Şekil 2.4'te verilmiştir.



Şekil 2.4. 3B hücre kültürü teknikleri. A. Mikro doku (sferoid) oluşumu, B. Hücrelerin doku iskelesi içerisinde oluşumu [28].

3B hücre kültüründe oluşturulan hücresel sferoidler (mikro doku), çeşitli hücre tiplerinin iskele desteği olmadan kendiliğinden bir araya gelerek hücre katmanlarının olduğu büyük hücre kümelerinden oluşmaktadırlar. Sferoidler, kendi hücre dışı matrikslerini oluşturduğu çok hücreli agregatlardan meydana gelerek optimal fizyolojik etkileşimlere sahiptirler. Bu mikro dokular içerisinde oksijen ve besin gradyanlarına bağlı bir şekilde çoğalan hücreler hareketsiz, nekrotik, apoptotik ve hipoksik olmak üzere çeşitli hücre katmanları oluşmaktadır. Canlı ve çoğalan hücreler genellikle kültür ortamlarından besin alabilen dış (perifer) katmanlarda bulunmaktadır. Merkezde yer alan hücreler ise oksijen ve besin maddesi açısından eksiklik yaşadıklarından dolayı hipoksik olma eğilimindedirler. Hücreler yerçekiminin etkisiyle süspansiyon içerisinde birbirlerine doğru yaklaşarak hücre kümeleri oluşturmaktadırlar. Böylelikle oluşan mikro dokular Diferansiyel Adezyon Hipotezi (DAH) olarak adlandırılmaktadır ve doku yüzey gerilimi kavramına odaklanılmıştır. Yüzey gerilimi ile birlikte hücreler arasındaki bağlantıları sağlayan proteinlerin ve hücre iskelet elemanlarının mikro doku oluşumunda etkisi bulunmaktadır. Sferoidler, tümör kütesinin fiziksel özelliklerine benzerlik göstermesinden dolayı tümör biyolojisindeki yapışma moleküllerinin araştırılması çalışmaları için sıklıkla tercih edilmektedir. Çok hücreli tümör sferoidleri tek tabakalı kültürlerle göre daha fazla ilaç direncine sahiptirler. Karaciğer, kalp, kas dokuları ve endotelial hücrelerin varlığı ile embriyonik doku oluşumları da sağlanmaktadır [28, 30, 31].

Hücrelerin doku iskelesine ekilmesiyle 3B bir ortamda mekanik olarak desteklenmeleri ve *in vivo* benzeri dokular sağlamaları ile 3B hücre kültürünün diğer model sistemini oluşturmaktadırlar. Bu iskeleler, kendi mikro ortamlarını oluşturabilmeleri için çeşitli malzemeler kullanılarak hazırlanmakta ve farklı tipteki hücrelerin tutunmasına olanak sağlamaktadır. Kullanılan malzemeler ile sentezlenen iskelelerin hücreler için toksik olmaması, biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir özellikte olmaları amaçlanmaktadır. İskeleler, her hücre tipi için *in vivo*da bulundukları dokunun HDM'sini taklit etmek üzere sentezlenmektedir. Uygun mikro ortamlarıyla hücrelere ilk desteği sağlayarak hücre yapışması, büyümesi, göçü, farklılaşması ve doku oluşumu için fiziksel ve biyolojik destek sağlamaktadırlar. Hücrelerin iskeleye daha iyi bir şekilde tutunabilmesi ve göç edebilmesi için farklı gözenek boyutlarına sahip yapılar oluşturulmaktadır. Gözenek boyutları ve şekilleri besinlerin, metabolitlerin ve atık maddelerin difüzyonu için önemli bir parametredir. Dondurarak kurutma tekniği gözenekli iskelelerin sentezlemenin en kolay tekniğidir. Doku iskeleleri hücre-hücre ve hücre-HDM etkileşimleri, homeostazı ve doku bütünlüğünü koruyan 3B bir iletişim ağı kurarak *in vivo* ortama en yakın nişi sağlamaktadır [29, 32]. Doku iskeleleri hücre için uygun bir ortam sağlayabilmek amacıyla doğal veya sentetik polimer malzemelerden sentezlenmektedirler. Doğal iskeleler, kollajen, jelatin, fibronektin, elastin, kitin, kitosan, fibrin, fibrinojen gibi HDM bileşenlerini içermektedirler. Sentetik malzemeler ile hazırlanan iskeleler polivinilalkol, poliamid, poli (laktik asit) (PLA), poli (glidikolik asit) (PGA), poli (laktik asit-ko-glidikolik asit) (PLGA) gibi polimerleri içermektedirler. Böylece hidrojel, kriyojel, matrijel, sünger, seramik gibi hedef hücreye uygun iskeleler hazırlanabilmektedir [33].

2.4. Kriyojeller

Kriyojellerin varlığı 1960'lı yıllara dayanmaktadır. Kelimenin kökeni Yunancada buz veya don anlamına gelen krios'tan (kryos) türetilmiştir [34]. Kriyojeller, monomer veya polimer öncüllerinin sıfırın altındaki sıcaklıklarda polimerizasyonuyla sentezlenen hidrojel sınıfına dahil edilen jel matrikslerdir. Kriyojel sentezi için uygulanan tekniğe kriyojelasyon (kriyotropik jelasyon) denmektedir. Makrogözeneklere veya süpermakrogözeneklere sahip kriyojeller hidrofilik, elastik ve süngerimsi bir yapıya sahiptir [35]. Doku mühendisliği ve *in vitro* çalışmalar için kriyojeller önemli bir ilgi görmektedirler [36].

Kriyojeller sahip oldukları makrogözenekler ile difüzyon akışını, atık alışverişini ve hücre tutunmasını başarılı bir şekilde gerçekleştirirler [37, 38]. Kriyojeller, kullanılacakları alana uygun monomer veya polimer öncüller ile farklı kimyasal reaksiyonlar uygulanarak istenilen şekil ve özelliklerde sentezlenebilmektedirler [35, 39]. Kriyojeller, öncüllerin fiziksel veya kimyasal olarak çapraz bağlanarak dondurulmasıyla oluşmaktadırlar. Jelleşmeyi sağlayan kimyasal reaksiyon bu süre içerisinde donmuş haldedir [40]. Son yıllarda özellikle biyomedikal uygulamalar için çeşitli yöntemlerle makro gözeneklere sahip hidrojel üretilmektedir. Bu çeşitli yöntemler gaz köpürtme, dondurarak kurutma, tuz/porojen şablonlama ve kriyojelasyondur. Bu yöntemler arasından kriyojelasyon yüksek oranda makro gözenekli 3B jeller üretmektedir. Mekanik olarak sağlam jellerin üretilmesini sağlayan kriyojelasyon yöntemi kolay, ucuz ve tekrarlanabilir olmasından dolayı sıklıkla biyomedikal uygulamalarda tercih edilmektedir [41]. Kriyojelasyon aşamasındaki fiziksel veya kimyasal olarak çapraz bağlanma, kullanılan monomer veya polimer öncüllerin moleküler ağırlıkları ve konsantrasyonları, polimer çözeltisinin donma sıcaklığı, donma hızı ve çözücü içeriği gibi parametreler kriyojellerin mekanik özelliklerini etkileyebilmektedir [42]. Gözenek oluşumu, boyutu, sayısı, jellerin elastik yapıları, adsorpsiyon ve gözenek duvarlarının kalınlığı kriyojelasyon koşullarına bağlı olarak kriyojellerin performansı etkilenmektedir. Bundan dolayı farklı koşullarda sentezlenen jellerin değişebilen özelliklerinin anlaşılması için dondurma aşamasındaki işlemlerin düzenliliği takip edilmelidir [41, 43]. Kriyojeller, kısmen donmuş monomer veya polimer çözeltileriyle sentezlenen 3B jel matrislerdir. En önemli özellikleri arasında gözenekli yapıları, hidrofilik yapıları, minimum mekanik özellikleri ve ozmotik stabiliteleri olduğu bilinmektedir [42]. Kriyojelasyon işlemi genel olarak; buz kristallerinin oluşumuyla faz ayrımının gerçekleşmesi, buz kristalleri etrafında donmamış sıvı fazdaki reaktiflerin çapraz bağlanması ve buz kristallerinin çözülmesini içermektedir. Çapraz bağlanma fiziksel ve kimyasal olarak iki farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir [41]. Çapraz bağlanma türü kriyojellerin mekanik özelliklerini etkilemektedir. Kriyojellerin sertliği, elastikiyeti ve su tutma özelliği ile gözenek boyutunu da etkileyerek şişme derecesi üzerinde etkili olduğu bilinmektedir [42]. Kimyasal çapraz bağlanmada monomerlerin veya polimerlerin kimyasal madde kullanılarak kovalent bağlar ile bağlanmasıyla kriyojeller oluşturulur. Fiziksel çapraz bağlanmada ise polimer zincirleri arasında kimyasal madde kullanılmadan fiziksel yollar ile hidrofobik ve iyonik bağlar meydana gelmektedir [41]. Kimyasal çapraz

bağlama ile sentezlenen kriyojeller fiziksel olarak çapraz bağlanmaya kıyasla daha kararlı ve stabil bir özellik göstermektedir [44]. Süpermakrogözenekli kriyojeller sentezleyebilmek için çapraz bağlanma hızı, çözücünün (su) donma hızından daha yavaş olmalıdır [45]. Sıcaklığında gözenek boyutu üzerine olan etkisi incelenmiştir ve büyük gözenekler oluşturabilmek için yüksek donma sıcaklığı ve düşük soğutma hızının kullanılması tavsiye edilmektedir [41, 42, 46]. Donma hızının yavaş olması buz kristallerinin daha büyük olmasını sağlayarak daha büyük gözeneklere sahip kriyojeller üretilmektedir [43]. Kriyojellerin hazırlanmasında suda çözünen monomerlerin kullanılması daha sık tercih edilmektedir. Reaksiyon bileşikleri kriyojellerin önemli özellikleri olan sertlik, gözenek duvarlarındaki kalınlık ve elastikiyetleri arttırmaktadır [42]. Düşük moleküler ağırlıklı öncüller daha büyük gözenekli kriyojellerin sentezlenmesini sağlamaktadır [41]. Kriyojeller, monomer veya polimer öncüllerinin çapraz bağlanması ve immobilize bir çözücü (su) ile çözünmesiyle oluşmaktadırlar. Jellerin sentezlenmesinde çözücü olarak toksik organik maddelerin kullanılması yerine su en yaygın kullanılan çözücüdür ve donma aşamasında oluşan buz kristalleri gözenek oluşturucu olarak işlev görmektedir [41, 42]. Kriyojeller, sentezlenmesinde çözücü madde olarak su kullanılan hidrojeller sınıfına dahil jel matrislerdir. Biyomedikal uygulamalarda kullanılan hidrojeller birbirine bağlı gözeneklerden ve elastikiyet özelliklerinden yoksun oldukları için soğuk ortamda polimerleşen kriyojellerin geliştirilmesine olan ihtiyacı arttırmıştır.

Kriyojeller, yüksek şişme kapasitelerine ve birbirine bağlı makro gözeneklerden oluşan hidrojellerdir [37]. Doku mühendisliği çalışmalarında hidrojellerin küçük gözeneklerinin olması hücre göçünü, çoğalmasını, oksijen, besin ve atık ürünlerin difüzyonunu sınırlamaktadır. Kriyojellerin ise büyük gözeneklere sahip olması hücre göçünü, çoğalmasını ve besin difüzyonunu önemli ölçüde arttırmaktadır [36, 47]. Kriyojeller, hidrojellere göre mekanik olarak daha dayanıklı jellerdir ve 200 µm'ye kadar gözenek boyutlarına sahip olabilmektedir. Makro gözenekler sayesinde çözünen maddelerin ve besinlerin difüzyonu sınırlanmadan gerçekleşmektedir [46]. Doku mühendisliği çalışmalarında kriyojeller daha sık tercih edilen matrislerdir.

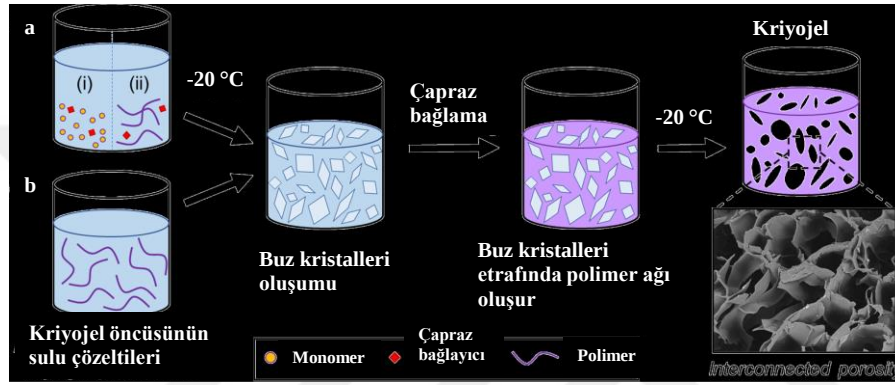
2.4.1. Kriyojellerin Sentezlenmesi

Kriyojeller sıfırın altındaki sıcaklıklarda kriyojelasyon yöntemi ile 3 ana basamakta sentezlenmektedir. i) monomer veya polimer öncülleri ile birlikte çapraz bağlanmayı sağlayan kimyasal maddelerin ve başlatıcıların olduğu polimer çözeltisi hazırlanır, ii) daha sonra hazırlanan polimer çözeltisi dondurulur ve jelleşme için bekletilir, iii) son olarak da sistem oda sıcaklığına çıkartılarak eritilir. Kriyojel sentezinde jelleşmeyi sağlayan kimyasal reaksiyon bu süre içerisinde soğuk ortamda gerçekleşmektedir [40]. Kriyojellerin sentezlenmesi Şekil 2.5'te şematik olarak verilmiştir.

Kriyojelasyon aşamasında ilk olarak kullanılacak kriyojel tipine göre monomer veya polimer öncüllerine karar verilir ve bir çözücü (su) içerisinde çözündürülür. Sonrasında çözeltiye çapraz bağlayıcılar ve polimerizasyon başlatıcıları eklenerek polimer çözeltisinin hazırlığı tamamlanmış olur [42]. Polimer çözeltisi oda sıcaklığında hazırlanmaktadır ve dondurma aşamasına geçmeden çözeltinin polimerleşmesi istenmeyen bir durumdur. Bu istenmeyen durumu engellemek için polimerizasyon başlatıcılarını çözeltiye eklemekten önce öncüller soğutularak çözündürülürler. Kriyojeller soğuk ortamlarda sentezlendiklerinden dolayı polimer çözeltisinin oda sıcaklığında polimerleşmeye başlaması kriyojellere özgü olan makrogözenekli yapıların oluşması engellenebilir [39]. Donma aşamasında, polimer çözeltisinin uygun sıcaklıkta polimerizasyonu başlatılır ve yaklaşık 24 saat soğuk ortamda inkübe edilir.

Jel çözeltisi genel olarak -5 ile -20 °C arasında soğutulmaktadır [36, 40]. Bu aşamada çözücü donarak birbirine bağlı buz kristalleri oluşturmaktadır. Buz kristalleri arasında ise jel çözeltisinin bir kısmı sıvı formda kalmıştır ve kristallerin etrafını sarmaktadır. Sıvı olarak kalan çözeltiye donmamış sıvı mikrofaz denmektedir [36, 46]. Polimerleşme, kimyasal reaksiyon ile buz kristallerinin etrafını sarak ağısı bir yapı oluşturan donmamış sıvı mikrofazda gerçekleşmektedir [35]. Buz kristalleri kriyojellere özgü olan makrogözeneklerin oluşmasını sağlayan bir ajan olarak rol oynamaktadır [42]. Polimerizasyon aşamasının tamamlanmasıyla birlikte donmuş olan sistem oda sıcaklığına çıkartılır. Buz kristalleri erimeye başlar ve kriyojel adı verilen biyomalzeme elde edilir. Çözünen kristaller yerini ağısı bir yapıya sahip olan birbirine bağlı makro ve süpermakro gözeneklere bırakmaktadır [40]. Kriyojel yapısında yer alan kristallerin yüzey gerilimi etkisiyle erimesinden dolayı yapıda gözenekler dairesel bir şekle sahiptir [42].

Birbirine bağı makro gözeneklerin oluşması çözünen maddelerin ve besinlerin difüzyonunu kolaylaştırmaktadır [46]. Gözeneklerin boyut ve şekillerinin, polimerizasyonun gerçekleştiği sıcaklık, donma hızı, monomer veya polimer öncüllerinin konsantrasyonu ve çözücüyeye bağı olarak değıştiğı bilinmektedir. Polimerizasyonda makro gözeneklerle birlikte mikro gözeneklerin oluştuğı gözlenebilmektedir. Süper makro gözenek boyutları 10-200 µm arasında değışmektedir [42].



Şekil 2.5. Kriyojel sentezlenmesi [37].

2.4.2. Kriyojellerin Kullanım Alanları

Kriyojellerin birbirine bağı makrogözenekleri, ozmotik ve mekanik kararlılıkları sayesinde biyolojik uygulamaların çeşitli alanlarında kullanımı büyük önem kazanmıştır. Farklı alanlarda kullanılabilen kriyojeller çalışma amacına uygun olarak istenilen şekillerde sentezlenebilmektedirler. Disk, küre, silindir, monolitik kolon (tek bir parça) gibi istenilen şekil ve boyutlarda üretilebilirler. Kriyojellerin sentetik veya doğal polimerlerle sentezlenebilmesi kullanımlarını avantajlı ve çok yönlü kılmaktadır. Kriyojeller, biyolojik nanopartiküllerin (hücre, virüs, plazmid, organel, protein, nükleik asit) kromatografisinde, hücre ve DNA saflaştırılmasında, biyopolimer veya hücrelerin immobilizasyonunda, ilaç dağıtım sistemlerinde, moleküler baskılamada, biyosensör ve doku mühendisliği uygulamalarında doku iskelesi olarak son yıllarda sıklıkla tercih edilen biyomalzemelerdir [38, 41, 48]. Ayrıca arıtma malzemesi olarak da kullanılmaktadırlar [48].

2.5. Kriyojellerin Doku İskelesi Olarak Kullanılması

Doku mühendisliği, hasarlı doku veya organın onarılmasını ve yenilenmesini amaçlayarak ortaya çıkmış bir alandır. Doku mühendisliği uygulamaları, hücrelerin ve büyüme faktörlerinin dahil edilerek dokunun mikro çevresini oluşturmak üzere 3B destek sağlayan yapı iskelelerinin üretilmesini ve kullanılmasını kapsamaktadır. Bu yapı iskeleleri hücrelerin tutunabileceği, çoğalabileceği ve farklılaşabileceği şekilde dokunun mikro ortamına uygun olarak sentezlenmelidir. 3B yapı iskelelerinin besin ve oksijen difüzyonunu ve atıkların uzaklaştırılmasını sağlayabilmesi için birbirine bağlı gözeneklerden oluşması gerekmektedir. Doku iskeleleri kullanım amaçlarına göre doğal veya sentetik polimerlerden ayrı olarak sentezlenebildikleri gibi birlikte de sentezlenebilmektedirler [46, 49]. HDM, hücre büyümesi için hücreye destek sağlayan, birden fazla bileşene sahip olarak dokuya özgü mikro ortamı sağlayan, hücrelerin birbirleriyle etkileşim içerisinde kalmasına yardımcı olan temel bir yapıdır. Dokuya özgü farklı HDM türleri bulunmaktadır. Hücrelerin bağlanması, göç etmesini, büyümesini ve sinyallere yanıt vermesini sağlayan bir ortam içerir. Ayrıca yapıya elastikiyet ve sertlik gibi mekanik özellikler sağlamaktadır. Büyüme faktörlerini içeren HDM biyoaktivitelerin güçlendirilmesine yardımcı olabilir. HDM, yara iyileşmesi, homeostaz ve morfogenez gibi dinamik süreçlere cevap olarak neovaskülarizasyonu ve yeniden şekillenmeyi sağlayabilecek bozunabilir fiziksel bir ortam sağlamaktadır. HDM'nin yapısında glikoproteinler, proteinler ve proteoglikanlar bulunmaktadır ve kolajen, elastin, fibronektin ve büyüme faktörleri düzenli olarak bulunduğu dokunun tipine göre sentezlenmektedir. HDM, hücrelerin veya dokuların biyolojik süreçlerinde karmaşık ve dinamik olarak önemli görevler yapmaktadır. Bundan dolayı doku mühendisliğinde üretilen doku iskelelerinin hedef dokunun doğal HDM'sini taklit edebilmesi önem taşımaktadır [36, 50].

3B doku iskeleleri hücre kültür çalışmalarında sıklıkla kullanılan 2B kültür tekniğine alternatif olarak geliştirilmiştir. 2B hücre kültür sistemlerinde hücreler düz plastik veya cam bir zemin üzerinde çoğaltılmaktadırlar. Hücre-hücre ve hücre-HDM etkileşimleri, hücre farklılaşması, morfolojileri, gen ifadesi, çoğalma ve sağkalım gibi süreçler 2B kültür sistemi ile 3B hücre kültürü arasında farklı şekillerde meydana gelmektedir [36]. 3B kültür sistemlerinde hücrelerin doğal mikro ortamını sağlayan HDM yapısını taklit edebilen doku iskeleleri hücrelerin büyüme ve farklılaşma potansiyellerini

arttırmaktadır. Bu durum hücrelerin doku oluşumunu sağlayarak 3B hücre kültür sisteminin farklı alanlarda kullanılmasını sağlamaktadır. Doku mühendisliği çalışmalarında (kıkırdak, kas, kemik, sinir rejenerasyon), yara iyileşmesinde, kök hücre farklılaşması ve kanser çalışmalarında 3B hücre kültür sistemleri doğal dokuyu taklit edebilmesinden dolayı son zamanlarda sıklıkla tercih edilmektedir. Doku iskelelerinin ana işlevleri hücrelerin tutunabileceği, çoğalabileceği, farklılaşabileceği ve sayısı artan hücrelerin canlılığının devam edebilmesi için gözenekli bir yapıya sahip olmasıdır. Birbirine bağlı gözeneklerden oluşan doku iskelelerinin oksijen, besin ve atık alışverişini maksimum düzeyde sağlayabilmesi hücrelerin canlılığını ve çoğalmasını etkiler [50, 51]. Doku mühendisliği bu faktörleri göz önünde bulundurarak dokuya özgü doğal HDM'yi taklit edebilecek doku iskeleleri sentezlemeyi amaçlamaktadır. Doku iskelelerinin her doku için farklı içerik ve bileşenlerle hazırlanması gerekiyor olsa da hazırlanan iskelelerin ana özellikleri ortaktır. Doku iskelelerinin kullanılabilir ve ideal olabilmesi için yapısında bulunması gereken bazı özellikler vardır. Bunlardan en önemlisi gözenek boyutudur. Hücreler doku iskelelerine ekildikten sonra gözeneklere tutunmaktadırlar. Uygun boyutta ve sayıda gözeneklerin olmaması çoğalmaya başlayan hücreleri nekroza sürükleyebilir. Oksijen ve besinlerin alışverişini de sağlayan gözenekler doku iskelesi için en önemli parametredir. İdeal bir doku iskelesinin uygun sayıda ve boyutta makro gözeneklere sahip olması, elastik olması, mekanik olarak dayanıklı olması, hidrofilik olması, kontrollü olarak biyobozunur olması, biyouyumlu olması, immün yanıt oluşturmaması, hücreler için toksik olmaması ve hücrelerin tutunabileceği bir ortam sağlaması gerekmektedir [34, 36, 42, 51]. Doku mühendisliği uygulamaları için hazırlanan doku iskelelerinin yapımında kullanılan biyomalzemeler kaynaklarına göre doğal veya sentetik polimerler olarak ikiye ayrılabilirler [50]. Çizelge 2.1'de doğal ve sentetik biyomalzemeler verilmiştir. Polimerler, doku iskelesi hazırlanmasında ayrı olarak veya bir arada kullanılarak dokunun ortamını en iyi şekilde taklit edebilirler. Biyomalzemeler gözenekli doku iskelesi oluşturmak için işlenmektedirler. Doğal biyomalzemeler ile hazırlanan doku iskeleleri HDM yapısında doğal formda bulunan bileşenlerle veya HDM bileşeni olmayan doğal malzemelerden sentezlenebilmektedirler. Kolajen, jelatin, hiyaluronik asit, kitosan, dekstran, agaroz, jelatin-fibrinojen doğal malzemelere örnek olarak verilebilir [40].

Doğal biyomalzemeler, hücreler için toksik etkisi bulunmayan, dokuların mikro ortamına en uygun, biyouyumlu ve biyobozunur malzemelerdir. Bu yüksek biyouyumluluk hücrelerin canlılıklarını koruyabileceği ve büyüyebileceği bir ortam sağlar. Ancak doğal biyomalzemeler fiziksel ve mekanik olarak yetersiz stabiliteye sahiptirler ve immün yanıt oluşturma riskleri bulunmaktadır. Bu dezavantajların olması sebebiyle hazırlanan doku iskelelerinin iyileştirilmesi ve güçlendirilmesi için sentetik biyomalzemeler kullanılmaya başlamıştır. Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), poli 2-hidroksietil metakrilat (PHEMA), poli (glikolik asit) (PGA), poli vinil pirolidon (PVP) ve poli laktik asit (PLA) sentetik malzemelere örnek olarak verilebilir [40]. Sentetik biyomalzemeler daha kontrollü fiziksel ve mekanik özelliklere sahiptir ayrıca yumuşak ve sert dokular için ayarlanabilmektedir [50]. Tek başına sentetik biyomalzemeler ile hazırlanan doku iskelerinin biyouyumlulukları doğal malzemelere kıyasla sorun haline gelebilmektedir. Hücrelerin tutunmasında ve büyümesinde zorluklar yaşanabilmektedir. Sentetik biyomalzemeler iyileştirilmek için işlemlerden geçmektedirler. Kullanım amacına uygun olarak hazırlanan doku iskelelerinin birden fazla biyomalzeme türü ile harmanlanıp üretilmesi sağlanmaktadır [40, 42, 50].

Çizelge 2.1. Doku iskelesi hazırlanmasında kullanılan doğal ve sentetik polimerler [34, 35, 40, 51].

<u>Doğal Polimerler</u>	<u>Sentetik Polimerler</u>
Kolajen	Poli 2-hidroksietil metakrilat (PHEMA)
Jelatin	Poli etilen glikol (PEG)
Kitosan	Poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA)
Hyalüronik asit	Poli (glikolik asit) (PGA)
Agaroz	Poli vinil alkol (PVA)
Selüloz	Polietilenimin (PEI)
Alginat	Poli vinil piroolidon (PVP)
Laminin	Poli kaprolakton (PLC)
Dekstran	Poli laktik asit (PLA)

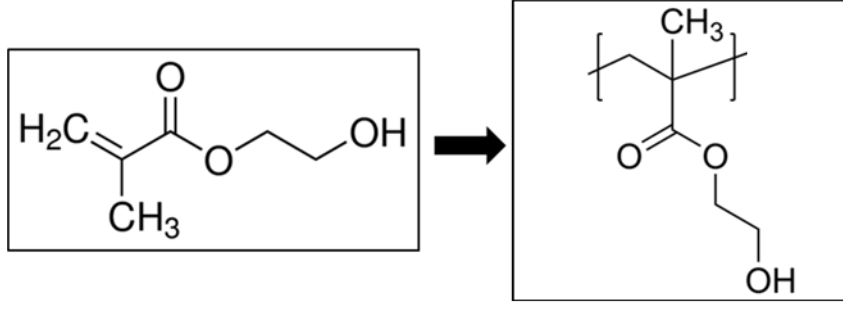
Doku mühendisliği uygulamaları için hazırlanan iskeleler çeşitli tekniklerle hazırlanmaktadır. Bunlar arasında dondurarak kurutma, gaz köpürtme, faz ayırma, fiber bağlama ve kriyojelasyon gibi teknikler bulunmaktadır [51]. Kriyojelasyon, monomer veya polimer öncüllerinin sıfırın altındaki sıcaklıklarda çapraz bağlanarak polimerleşmesiyle açığa çıkan jellerin sentezlenme yöntemidir. Kriyojelasyon doku mühendisliği uygulamalarında son yıllarda daha sık tercih edilmeye başlamıştır. Doku iskelelerinin sentezlenmesindeki en büyük sorun gözenek boyutunun uygun genişlikte ayarlanamamasıdır. Bu durum hücrelerin büyüme ve çoğalma potansiyellerini olumsuz yönde etkilemektedir.

Yeterli çoğalma alanının olmaması hücrelerin canlılıklarını kaybetmelerine neden olmaktadır. Gözenekler hücrelerin tutunmasının haricinde oksijen ve besin alışverişlerini sağlayarak hücrelerin sağlıklı bir şekilde büyümelerini sağlamaktadır. Hipoksi durumda oluşan serbest radikaller hücreleri ölüme sürüklemektedirler. Bundan dolayı geniş gözeneklere sahip doku iskelelerinin oluşturulmasına olan ihtiyaç artmıştır. Kriyojelasyon yöntemi ile sentezlenen kriyojellerin makro veya süper makro gözeneklere sahip olması doku mühendisliği çalışmalarında kullanımlarını avantajlı kılmaktadır. Kriyojeller, HDM yapısını en iyi şekilde taklit edebilen doğal ve sentetik biyomalzemeler ile hazırlanabilen 3B mekanik olarak dayanıklı jel matrislerdir. Heterojen bir yapıya sahip olan kriyojeller hidrojel sınıfindandır. Hidrojellere göre daha avantajlı bir iskele olması çeşitli alanlarda kullanımını arttırmaktadır. Ayrıca doku vaskülarizasyonunu ve yeni doku oluşumunu yapısındaki doğal biyomalzemeler sayesinde daha hızlı gerçekleştirebilmektedir [34, 36, 51] [43]. Doku mühendisliği ve çeşitli alanlarda kriyojellerin doku iskelesi olarak kullanılması daha avantajlıdır.

2.6. Poli (2-Hidroksietil Metakrilat) (PHEMA)

Poli (2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA), 2-hidroksietil metakrilat (HEMA)'ın kimyasal bir madde ile çapraz bağlanmasıyla oluşan sentetik bir biyomalzemedir. Şekil 2.6'da HEMA'nın çapraz bağlanmasıyla oluşan PHEMA'nın kimyasal yapıları verilmiştir. PHEMA biyomalzemeleri biyomedikal uygulamalar için sıklıkla kullanılmaktadır [52].

Yüksek biyoyumluluğu, toksik olmaması, antijenik özellikler göstermemesi, mekanik olarak sağlam olması ve oksijen geçirgenliğinin olması PHEMA malzemelerin doku iskelesi olarak kullanılabilirliğini arttırmaktadır. Ayrıca PHEMA canlı dokulara benzer fizikokimyasal özellikler göstermesiyle uygun bulunmuştur [52-54]. PHEMA biyomalzemesi kontakt lens yapımında, ilaç dağıtım sistemlerinde, biyomedikal uygulamalarda, suni implant yapımında, sentetik deri çalışmalarında, hücre kapsülleme ve doku mühendisliğinde doku iskelesi olarak kullanılmaktadır [53, 55]. Kriyojellerin sentezlenmesinde PHEMA biyomalzemeler son yıllarda sıklıkla tercih edilmektedir. PHEMA kriyojellerin yüksek sıcaklıklara, asit ve alkali hidrolizlerine dirençli olduğu bilinmektedir [54].



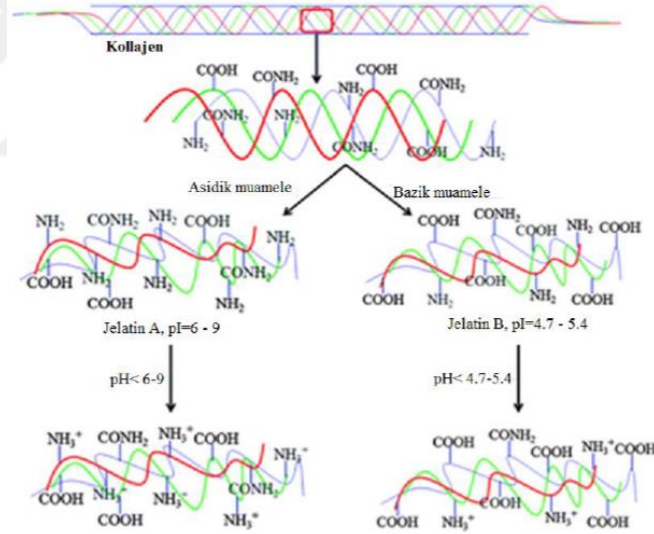
Şekil 2.6. HEMA ve PHEMA'nın kimyasal yapısı [55].

PHEMA'lar olumlu özelliklerine ve doku mühendisliğinde sıklıkla tercih edilmesine rağmen hücrelerin yüzeyine yapışmasında tek başına yeterli değildir. Bundan dolayı doku iskelelerin sentezlenmesinde sentetik malzeme olan PHEMA'ya destek amaçlı doğal malzemeler olan kolajen, jelatin, fibronektin yapıya katılarak hücrelerin daha iyi tutunabileceği ve canlılıkları devam ettirebileceği bir iskele ortamı sağlanmaktadır [56].

2.7. Jelatin

Kolajen, HDM yapısında bol bulunan temel bir proteindir. Hücre kültürü ve doku mühendisliği çalışmalarında tek başına veya farklı biyomalzemeler ile birlikte kullanılabilir. Kolajenin asit veya baz ile kontrollü hidrolizi sonucu kolajene benzer kimyasal yapıya sahip denatüre bir protein olan jelatin açığa çıkmaktadır. Jelatin, immünojenik olmayan kolajenin yan ürünüdür ve denatürasyon ile patojenlerin ortadan kaldırılması sağlanmıştır [57, 58]. Jelatinin yüksek biyouyumlu, kolay biyobozunabilir, düşük maliyetli olması ve immünojenisitesinin olmaması sayesinde kozmetik, gıda ve doku mühendisliği çalışmalarında iskeleye destek elemanı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [59]. Ayrıca hücre yapışmasını arttıran arginin-glisin-aspartik (RGD) dizilerini bol miktarda içermektedir. Jelatinin çeşitli fonksiyonel grupları içermesi çarpaz bağlacılar ve hedef ligandlar için kimyasal modifikasyonları sağlamaktadır, böylelikle ilaç çalışmalarına olanak tanıyabilir [60]. Jelatin yaygın olarak domuz, sığır ve balık gibi hayvan kaynaklarının deri, kemik ve beyaz bağ dokularından elde edilmektedir [59, 61]. Amino asit içeriği elde edilen dokunun tipine göre değişebilir de jelatin amino asit bakımından zengin bir proteindir. Kolajenin hidroliz sürecine bağlı olarak iki farklı jelatin tipi elde edilmektedir. Kolajenin asitle işlenen jelatin ürününe A tipi jelatin, alkali ile işlenen jelatin ürününe ise B tipi jelatin denmektedir.

İki tip jelatin aynı kolajen kaynağından elde edilmelerine rağmen farklı yöntem ile üretilmelerinden dolayı farklı fiziko-kimyasal özellikler gösterirler ve farklı alanlarda kullanılmaktadırlar [62]. Amino asitlerin dağılımı ve kimyasal bileşimleri jelatinin dayanıklılığını etkilemektedir. Gly-X-Y üçlüsünde X ve Y'nin sırasıyla genellikle prolin (Pro) ve hidroksiprolin (Hypro) amino asitleri olduğu bilinmektedir. Tip A jelatin prolin ve glisin amino asitleri açısından zengindir ve tip B jelatine göre daha dayanıklı bir yapıya sahiptir (Şekil 2.7). İzoelektrik noktası ise yaklaşık olarak 8.0 ile 9.0 değerleri arasındadır. Tip B jelatinin yapısı tip A'ya göre daha kırılıgandır ve izoelektrik noktası yaklaşık 4.8 ile 5.4 değerlerindedir [39, 60, 63]. Şekil 2.7'de kolajenin hidrolizi ile jelatinin açığa çıkması ve tip A ile tip B jelatin eldesi verilmiştir. Jelatinin fonksiyonel özellikleri kimyasal özelliklerine bağlıdır. Amino asit bileşimleri jelatinin viskozitesini, jel kuvvetini, dayanıklılığını ve erime noktasını belirlemektedir. Prolin ve hidroksiprolin jelatinin jelleşmesini düzenlemektedir [58].



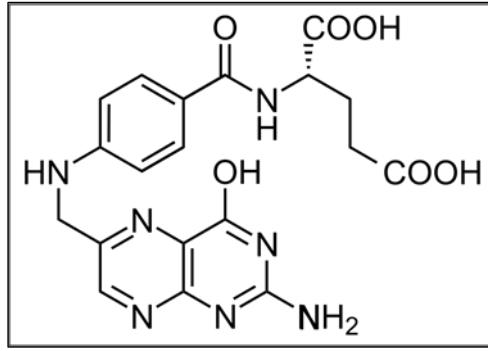
Şekil 2.7. Tip A ve tip B jelatinin elde edilmesi [61].

HDM, hücrelerin yapışmasını sağlayan proteinleri, sinyal moleküllerini, büyüme faktörlerini içeren karmaşık ve destek görevi olan bir yapıdır. Doku mühendisliği için protein içeriğini, büyüme faktörlerini ve mekanik özellikler açısından hücrelerin mikro çevresini içeren HDM'yi yansıtabilecek 3B doku iskeleleri tasarlayabilmek önemlidir. Literatür araştırılması sonucunda jelatinin oluşturulan iskele yapısına katılması hücrelerin tutunmasını, yayılmasını, büyümesini ve göçünü arttırdığı görülmektedir [60]. Jelatin tek başına kullanılan bir protein olmakla birlikte farklı hücre tiplerinin

mikro çevresinin oluşturulmasında ve hücrelerin *in vivo*ya daha yakın bir ortamda çoğabilmesi için HDM'yi yansıtan diğer protein, makromoleküller vb. gibi yapılar da jelatin ile birlikte kullanılmaktadır. Çalışmalar, jelatin ile birlikte kalsiyum fosfat seramiklerinin ve sentetik polimerlerin kullanılmasının oluşturulan yapının mekanik özelliklerini iyileştirdiğini göstermektedir [64]. Jelatinin tek başına ve çeşitli biyomalzemelerle kombinasyonunun ilaç dağıtım alanındaki çok yönlü aktivitesinin anlaşılmasını sağlamıştır [60]. Jelatinin kriyojelleştirilmesinde ve çapraz bağlama maddesi olarak gluteraldehitin kullanılması gözenekli bir kriyojel iskelesini ürettiği bilinmektedir [57]. Tez çalışma kapsamında da jelatin için gluteraldehit çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Gluteraldehitin hücreler üzerinde diğer çapraz bağlayıcılara göre daha az toksik olması, ekonomik ve kolajen türevlerini etkili bir şekilde bağlaması tercih edilme nedenlerini arttırmaktadır [39].

2.8. Folik Asit (FA)

Folik asit, vücudun yeni hücrelerin oluşturmaya yardımcı olan, suda çözünebilen B vitamini ailesindendir. B9 vitamini, folat pteroilglutamik asit ve pteroilglutamik olarak da adlandırılmaktadır. Folik asit 1941 yılında ıspanaktan izole edilmiştir. Yeşil yapraklı sebzelerde bol bulunan folik asit latinceye yaprak anlamına gelen foliumdan türetilmiştir. Folat doğal olarak vücutta sentezlenen bir vitamindir, folik asit ise güçlendirilmiş gıdalarda ve takviyelerde folatın (B9 vitamini) sentetik olarak değiştirilmiş formudur. Folat terimi, hem doğal folatın hem de folik asitin aktivitelerini kapsayan temel bir terimdir. Folik asitin kimyasal formülü $C_{19}H_{19}N_7O_6$ şeklindedir ve Şekil 2.8'de verilmiştir. Molekül kütlesi ise 441,4 g/mol'dür. Ispanak, pancar, brokoli, brüksel lahanası, bulgur, tahıllar, somon, maydanoz, yumurta, fıstık, alabalık, portakal suyu, süt gibi besinlerin folat açısından zengin olduğu bilinmektedir [65, 66]. Folat, ısıya dayanıklı değildir ve besinler yüksek ısılarla maruz kaldığında folik asitin etkisi yok olmaktadır [67].



Şekil 2.8. Folik asitin kimyasal yapısı.

Besinlerde bulunan folatlar ince bağırsak epitelinde yer alan karboksipeptidaz enzimi aracılığıyla poliglutamil olarak parçalanmaktadır ve serbest folat olarak ince bağırsağın üst kısmından absorpsiyonu sağlanmaktadır. Çoğu karaciğerde depolanmaktadır ve metabolizması mitokondri ve sitoplazmada gerçekleşmektedir. Folik asit türevleri, amino asitleri birbirine dönüştürmek, eritropoezi sürdürmek, tRNA'yı metillemek, pürin ve timidilat nükleik asitleri sentezleyebilmek için hücreler arasında reseptör aracılı endositoz ile taşınmaktadır. Folik asit, yüksek homosistein seviyelerini metionin sentetaz aracılığıyla metionine remetilasyonunu sağlayarak düşürmektedir. Folatın serumda bulunan formu metiltetrahidrofolattır ve biyosentetik aktiviteler için kimyasal olarak aktif formudur [65, 66, 68]. Folik asit, histidin, serin ve glisin, metionin ve pürin gibi insan vücudundaki önemli biyokimyasal süreçlerde yer almaktadır. Folik asit, vücuttaki biyokimyasal süreçlerin devamlılığı için önemli bir vitamindir. Hücre büyümesi ve farklılaşması gibi önemli olaylara katılan folik asidin eksikliğinde ciddi sağlık problemleri meydana gelmektedir [66]. Eksikliğinde görülen en yaygın hastalık megaloblastik anemi ve doğum kusurlarıdır [66]. Yetersiz beslenme, çevresel ve genetik faktörler folat eksikliğine sebep olmaktadır. Ayrıca, gebelik, emzirme, hemolitik anemi, inflamatuvar hastalıklar, ergenlikte hızlı büyüme, diyaliz durumu gibi süreçlerde folata olan gereksinimler artmaktadır [67]. Hamilelikte, embriyonik ve fetal gelişimin önemli bir özelliği artan hücre bölünmesidir ve buna bağlı olarak büyüyen bebeğin kan ihtiyaçları da artmaktadır. Bu durum hamilelikte folik asit gereksinimini arttırmaktadır. Folatın, nükleik asit sentezinde merkezi bir rolü bulunmaktadır. Hamilelik sürecinde kırmızı kan hücrelerin artışıyla birlikte uterusun genişlemesi, plasantanın oluşması ve fetüsün büyümesi önemli süreçlerdir. Hamileler için folik asit alımı 400 µg/gün olarak önerilmektedir.

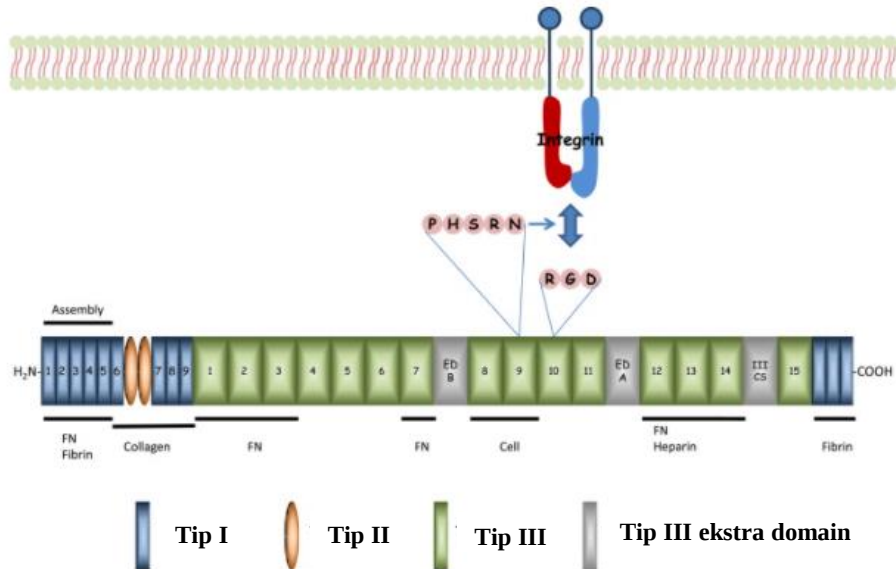
Folat eksikliğinin gebeliğe bağlı hipertansiyon, plasental ayrılma, preeklampsiye neden olduğu ayrıca maternal eritropoezi, uterus, meme bezi ve plasentanın büyümesini engellediği bilinmektedir [69, 70]. Folik asit, DNA replikasyonu sırasında amino asit sentezi ve vitamin metabolizmasındaki enzimatik reaksiyonlar için substrat olarak gerekli temel bir besindir. Fetal gelişimde hücre bölünmelerinde artış yaşanmaktadır ve hızlı bölünen hücrelerde folik asit eksikliği DNA sentezindeki düzensizliklere neden olmaktadır [65]. Folik asit eksikliğinde fetüslerde nöral tüp defektleri (NTD'ler) görülmektedir [67]. Nöral tüp defektlerinin (NTD'ler) gelişimi çevresel faktörler ve yetersiz beslenme durumlarıyla (düşük folat alımı) da ilişkilendirilmiştir. Yapılan klinik deneylerde, gebelik öncesi folik asit takviyesinin sağlanmasıyla NTD'lerin bir kısmının önlenildiğini göstermektedir [71]. Özellikle hamilelik sürecinde ve fetal gelişimde önemli etkileri olan folik asitin takviyesi sağlanmalıdır.

2.9. Fibronektin (FN)

HDM, her hücre tipinin kendi mikro çevresini oluşturabildiği, damar sisteminin gelişmesi ve modellenmesi ve kök hücre nişlerinin düzenlenmesini sağlayan bir sistemdir. Büyüme, gelişme, yaşlanma ve hastalık gibi süreçlere uyum sağlamaktadır [24, 72]. HDM glikoproteinlerinden biri olan fibronektin (FN) vasküler gelişimle ilgili çalışmalarda en fazla yer alan proteindir. FN HDM proteini olarak keşfedilmesinden önce erken embriyonik damarların çevresinde eksprese edildiği bilinmektedir [24]. Hücre kaynağına bağlı olarak % 4-9 karbonhidrat içermektedirler [73]. FN, embriyogenez, doku ve yara onarımı, kan pıhtılaşması, hücre göçü ve yapışması dahil olmak üzere birçok hücresel süreçte HDM'nin temel bileşeni olarak yer almaktadır [74, 75]. Düzenli bir FN matriksinin olmaması iyileşmeyen yaralara, doğum kusurlarına ve fibrotik hastalığa neden olmaktadır [76]. Fibronektinin iki formu bulunmaktadır. Bunlar; HDM'de bağlayıcı görevi olan çözünmeyen glikoprotein dimeri fibriller olarak ve plazmada çözünür bir şekilde disülfid bağlantılı dimer olarak bulunmaktadır. Çözünür FN'nin HDM fibrillerine dönüşümü aktif ve hücreye bağlı bir süreçtir. FN, hepatositler tarafından sentezlenerek kan plazmasına salgılanmaktadır. 300-400 µg/ml'de çözünür ve inaktif şekilde dolaşmaktadır. HDM'de ise FN'ler; kondrositler, endotel hücreler, makrofajlar, fibroblastlar ve bazı epitel hücreleri tarafından sentezlenmektedir [74, 75, 77].

FN, çubuk benzeri bir yapıya sahiptir. Tip I, II, III homologlarının birbirlerini tekrarlayan modüllerinden oluşmaktadır. Üç modülün tekrarlanan düzenlenmesiyle anahtar bağlanma bölgelerini gösteren FN proteini Şekil 2.9'da gösterilmiştir. FN molekülleri genel olarak, bir çift disülfid bağı ile karboksi terminallerinde kovalent olarak bağlanmış iki aynı alt birimden oluşan yaklaşık 500-600 kDa'dan oluşan bir dimer olarak bulunmaktadır. FN dizisi yaklaşık % 90'ını oluşturan on iki tip I modül, iki tip II modül ve en bol bulunan hücre tipine ve koşullara bağlı olarak 15-17 tip III modülden oluşmaktadır. Tip I modül, karboksi ve amino-terminal bölgesini oluşturur ayrıca kollajen ve fibrin bağlanmasına katılmaktadır.

Yaklaşık olarak 40 amino asit uzunluğunda olup iki disülfid bağı içermektedir. Tip II modül, kollajen bağlanmasında etkili olup yaklaşık 60 amino asit uzunluğu ve iki zincir içi disülfid bağı içermektedir. Tip III modül ise integrin ve heparin bağlanma bölgelerini içermektedir. Ayrıca RGD reseptörü tanıma dizisi taşımaktadır. 900 amino asit uzunluğunda ve disülfid bağı içermemektedir. FN yapısında iki fibrin bölgesini de (Fibrin I ve Fibrin II) bulundurmaktadır. Hücre yapışması ve göçü için fibrin ile etkileşimleri önemli bulunmuştur [73, 74]. FN birçok bağlanma noktası içermesinden dolayı çeşitli hücresel işlevlerde rol almaktadır.



Şekil 2.9. Üç tip modülün tekrarlanan düzenlenmesiyle anahtar bağlanma bölgelerini gösteren FN proteini [78].

Fibronektin hamilelik sürecinde ve fetal gelişimde rol almaktadır. Anne tarafından üretilen plasental FN ve fetüs tarafından üretilen fetal FN çeşitleri bulunmaktadır. Hamile bireylerde yaşanmakta olan stres plazma kortizol seviyelerinde artışa neden olarak FN'nin aktivitesini inhibe etmektedir ve bu durum erken doğum ve plasental değişmelere yol açabilmektedir [76]. Doku onarımı için HDM fibronektini hücreler destekler ve diğer HDM proteinlerinin organizasyonlarını düzenlemektedir [75]. HDM proteini olan fibronektin doku iskeleleri üzerinde doku tipine ve mikro ortamına bağlı olarak eklenebilmektedir. Ortamda hücreler için mikro doku oluşumunu uyarır, iskelet kasında vasküler tonu düzenler, yeni damarların oluşmasını ve birleşmesini destekler, hücrelerin ortama yapışmasını, büyümesini ve göçünü destekleyerek çeşitli görevlerde yer almaktadır [72].

2.10. Kolajen Tip IV (KOL Tip IV)

HDM epitel ve fibroblast hücrelerinden sağlanan elastin, kolajen, glikoprotein ve proteoglikanları içermektedir. Kolajen, hücre davranışlarını düzenlemede ve doku bütünlüğünü korumada hücre dışı matriksin yapısal proteini olarak yer alan önemli bir bileşendir. Kemik, kan damarları, deri, tendon ve kornea gibi farklı dokularda bulunmaktadır. Kolajen molekülü, üç α polipeptit zincirinin birbiri üzerine sarmal bir şekilde dolanmasıyla oluşmaktadır. 300 nm uzunluk ve 1,4 nm genişliğinde çubuk şeklinde bir yapıdır. Bir α zinciri 1000 amino asit içermektedir. Kolajen yapısında karboksil (COOH) ve amino (NH₂) ucu taşımaktadır. Kolajen proteinin farklı tipte fibrilleri bulunmaktadır. Kolajen tip I, II, III, IV, V ve daha fazlası bulunmaktadır. Fibriller (tip I ve III), ağ oluşturanlar (tip IV, VIII) veya boncuklu filamentler (tip VI) şeklinde bulunmaktadır. Kolajen tip I fibroblastlar, osteoblastlar, kas hücreleri ve odontoblastlar tarafından sentezlenmektedir. Gerilmeye karşı dayanıklılığı arttırmaktadır. Tip II, kondroblastlar tarafından sentezlenmektedir ve kıkırdakta bulunurlar. Tip III, fibroblastlar tarafından sentezlenen bu bileşikler bağırsak duvarlarında ve kan damarlarında bulunmaktadır. Tip IV ise epitel ve endotel hücreler tarafından sentezlenmektedir ve bazal laminanın özel bir bileşenidir [5, 79]. Kolajen tip IV, bazal membranda bol bulunarak hücrelerin yapışması, büyümesi, göçü, hayatta kalması, doku yenilenmesi ve yara iyileşmesi süreçlerinde aktif olarak görev almaktadır. Bazal membran bileşenleriyle etkileşime girerek ağ oluşturan kolajen tip IV destek sağlamaktadır.

Epitel ve damar endotel hücreleri tarafından sentezlenen kolajen tip IV destek ile birlikte filtrasyon işlevini de sağlamaktadır [79]. Omurgalılarda α zincirinin altı farklı zinciri ($\alpha 1$ - $\alpha 6$) ifade edilmektedir. Bu farklı α zincirleri altı farklı gen (COL4A1, COL4A2, COL4A3, COL4A4, COL4A5 ve COL4A6) tarafından kodlanmaktadır. Kolajen tip IV'ün ağ yapısı -tanıma dizileri- üç farklı heterotrimerik molekül olan $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ (IV), $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ (IV) ve $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$ (IV) ile oluşmaktadır. $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ (IV) formu baskın bir şekilde tüm bazal membranlarda bulunmakta ve embriyonik gelişimde rol almaktadır. $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ (IV) formu akciğer alveolar, böbrek glomerulusu, testis ve göz gibi çeşitli dokuların bazal membranlarında bulunmaktadır. Embriyonik gelişim sürecinde yoğun olarak bulunan $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ (IV) gelişimsel dönemde geçişte özellikli dokular için diğer formlara dönüşebilmektedir, ancak fetal gelişimde $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ (IV) ağının fetal dağılımını korumaktadır [80]. Ayrıca, kolajen HDM de yer alan molekülleri, proteinleri, büyüme faktörlerini bağlayan reseptörleri sayesinde HDM hücre davranışını düzenleyebilmektedir. Kolajenin farklı reseptörleri bulunmaktadır. Bunlardan; lökosit ile ilişkili immünoglobulin benzeri reseptörler (LAIR) trofoblastlar tarafından ifade edilmektedir. Kolajen tip IV'ün trofoblast hücreleri tarafından salgılandığı, plasenta dokusunda, fetal damar duvarında, miyometriyumda güçlü bir şekilde ifade edildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [5]. Kolajen ve tipleri dokulara mekanik ve fiziksel destek ve bütünlük sağlamaktadır.

2.11. Antidepresan İlaçların Gebelikte Kullanılması

Sık görülen bir ruh sağlığı problemi olan depresyon, bireylerin yaşam kalitesini düşürmektedir. Kadın, erkek, genç ve yaşlı bireylerde yaşam standartlarına, genetik, çevresel ve hormonal faktörlere bağlı olarak depresyon sıklıkla görülmektedir. Kadınlarda 18-45 yaş aralığında daha sık görülen hamilelik durumu, doğum ve lohusalık gibi süreçlerden dolayı depresyon yüksek oranda görülmektedir [2]. Hamileliğin başlangıcında ve devamında bir kadının vücudu fiziksel ve hormonal olarak değişimler yaşamaktadır. Bu durum gebe bireylerin değişen koşullara adaptasyonu sırasında strese, kaygıya, endişeye neden olabilmektedir ve majör depresif bozukluk hamile kadınların yaklaşık olarak % 4-7'sinde [81], depresyon ve depresif belirti gösterme sıklığı ise % 12-36 arasında değişmektedir [2]. Gebelik depresyonu anne ve fetüsü olumsuz olarak etkilemektedir. Preeklampsi, erken doğum, fetüs gelişimde gerilik, düşük doğum gibi olumsuz durumlara depresyonun etkisi bilinmektedir.

Tedavi edilmemiş gebelik depresyonu postpartum depresyonu için büyük bir risk taşımaktadır. Postpartum depresyonu, anne ile bebek arasında oluşan bağın engellemesine, davranışsal ve duygusal gelişimde sorunlara neden olabilmektedir [82]. Hamilelikten önce depresyon öyküsü olan kadınların antidepresan tedavisi görmemesi ya da tedaviyi yarıda kesmesi % 60-70'inde belirtilerin nüksetmesine yol açmaktadır [83]. Gebelikte ilaç kullanımı anne ve fetüsün sağlığını yakından ilgilendirmektedir. Alınan ilacın tipi, alınma sıklığı, dozu, plasentadan geçişi, dağılımı, metabolizması, fetüsün ilaca tepkisi, annenin beslenmesi gibi faktörler ilaçların fetüs üzerindeki etkilerini belirlemektedir. Son yıllarda antidepresanların ve antibiyotiklerin gebelikte en sık kullanılan ilaç grupları olduğu anlaşılmıştır [84]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda gebelik depresyonunda kullanılabilecek en güvenli ve en sık reçete edilen antidepresanların seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI) olduğu ileri sürülmüştür [2, 85]. SSRI grubunda; Essitalopram, Fluvoksamin, Fluoksetin, Paroksetin, Sitalopram ve Vortiksetin etken maddeli antidepresanlar bulunmaktadır. SSRI'lar serotonin (5-HT) geri alım taşıyıcısını (SERT) hedef alarak serotoninin geri alımını engellerler, böylece sinaptik boşlukta serotonin seviyelerini arttırmaktadırlar [86].

Plasenta anne ve fetüs arasında kan dolaşımı aracılığı ile besinlerin ve atıkların taşınmasını sağlamaktadır. Ayrıca hamileliğin devamını sağlayan endokrin işlevleri bulunmaktadır [86]. Gebelikte kullanılan antidepresan ilaçların plasentadan geçtiği bilinmektedir [85]. SSRI'ların kordon kanında ve amniyon sıvısında bulunması plasentadan geçme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. Embriyogenez ve plasantasyon süreçlerinde aktif olan trofoblast hücrelerinin SSRI'lara maruz kalması sonucunda trofoblastların endometriyuma invazyonu, anjiyogenez, trofoblastların farklılaşması gibi süreçleri olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bu da düşük doğum, erken doğum, plasentadan besin ve oksijenin yetersiz taşınması, gerilemiş fetal gelişim ve preeklampsi durumlarına neden olabilmektedir [81]. Gebelikte kullanılan antidepresanların plasenta aracılığı ile fetüse geçmesi ve oluşturabileceği risklerden dolayı bu konudaki çalışmalara olan ihtiyaç artmıştır. Gebelikte kullanılan SSRI'ların plasenta üzerindeki etkileri hala tam anlamıyla netliğe kavuşmamıştır.

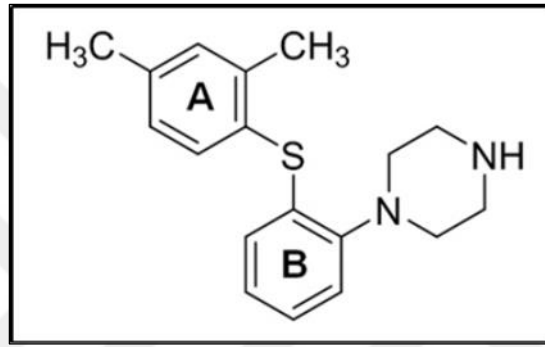
2.12. Brintellix ve Etken Maddesi Vortiksetin

Majör depresif bozukluk (MDD), dünya çapında en yüksek ikinci sağlık sorunudur. Dünya yetişkin nüfusunun % 6'sı kadarını etkilemektedir ve erkeklere oranla kadınlarda

iki kat daha fazla görülmektedir. Yeni nesil antidepresan olan Brintellix'in etken maddesi Vortioksetin, yetişkinlerde majör depresif bozukluğunun tedavisi için ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından Eylül 2013 yılında onaylanmıştır [87, 88]. Yeni nesil bir antidepresan olan Vortioksetin multimodal aktiviteye sahip bir ilaçtır. Serotonin agonistini ve antagonistini yapısında bir arada bulunduran ilk karma antidepresandır [88]. Vortioksetinin etki mekanizması, serotonin (5-HTT) geri alım taşıyıcısının engellenmesini ve serotonin reseptör aktivitesinin modülasyonunu bir araya getirmektedir. 5-HT_{1A} reseptör agonistidir, 5-HT_{1B} reseptörü kısmi agonisti; 5-HT₃, 5-HT₇ ve 5-HT_{1D} reseptör ise antagonistir ve bir 5-HTT inhibitörü ilave edilerek ilaca fonksiyon kazandırılmıştır. İlave serotonin reseptörleri ve hedefleri Vortioksetin'i diğer SSRI'lardan ayırarak etkinliğini güçlendirmektedir. Vortioksetin aynı zamanda asetilkolin, glutamat, dopamin, histamin, ve noradrenalin gibi bilişsel düzenlemede önemli olan nörotransmitterleri modifiye edilerek hücre dışı konsantrasyonunu arttırmaktadır [88, 89]. Bu özellikleriyle majör depresif bozukluğundaki duygu durum değişikliklerini ve bilişsel bozuklukları düzenlemektedir.

Vortioksetin, (1-[2-(2,4-dimetil-fenilsülfanil)-fenil]-piperazin, hidrobromür) kimyasal yapısı ile bis-aril-sülfanil amin sınıfındadır. Moleküler ağırlığı 379.36 g/mol, molekül formüle ise C₁₈H₂₂N₂S-Hbr'dür ve Şekil 2.10'da kimyasal yapısı verilmiştir. Vortioksetin yaklaşık % 80-90 oranında plazma proteinlerine bağlanma gösterdiği için geniş bir dağılıma sahiptir. İlacı aldıktan sonra plazma konsantrasyonuna yaklaşık olarak 3-16 saat aralığında ulaşmaktadır ve terminal yarılanma ömrü 60-70 saat civarlarında olabilmektedir. Vortioksetin farmakokinetiğinin doğrusal ve dozla orantılı olduğu anlaşılmaktadır [88]. Vortioksetinin ortalama mutlak biyoyararlanımı % 75 olarak bilinmektedir [87]. Metabolizmasında başta sitokrom P450 (CYP450) ve 2D6 (CYP2D6) olmak üzere çoklu CYP450 izoformları bulunmaktadır. Vortioksetin, P450 enzimleri yoluyla oksidasyon ve sonrasında üridin difosfat glukuronosiltransferaz yoluyla glukuronik konjugasyon tarafından metabolize edilmektedir. Vortioksetinin ana metaboliti Lu AA34443'tür. Ancak 5-HTT reseptörlerine bağlanmadığı için farmakolojik olarak inaktiftir. Minör metabolit ise serotonin geri alım taşıyıcısını (SERT)'yi inhibe eden Lu AA39835'tir ve kan-beyin bariyerini geçmediği düşünülmektedir. Bundan dolayı farmakolojik olarak minimum bir etkiye sahiptir. Vortioksetin farmakolojik aktivitesinden birincil olarak sorumludur [87].

Antidepresan ilaç gebelik kullanımı için C kategorisinde yer almaktadır. Gebe bireylerde etik sebeplerden dolayı çalışmalar yapılamadığı için ilacın etkisine dair yeterli bilgiler bulunmamaktadır. Gebe sıçan ve tavşanlar ile *in vivo* çalışmalarda, organogenez döneminde 160 ve 60 mg/kg/gün oral dozlarda Vortiksetin verildiğinde teratojenik etkinin görülmediği gösterilmiştir [89]. Ancak yapılan bu çalışmalar Vortiksetin etkisini tam olarak anlayabilmek için yeterli değildir ve yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. *In vitro* koşullarda oluşturulacak plasenta modelleri ile Vortiksetin sitotoksitesinin oluşturulan 3B modelde incelenmesi amaçlanmaktadır.



Şekil 2.10. Vortiksetin etken maddesinin kimyasal yapısı [87].

2.13. Hücre Karakterizasyon Testleri

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan hücreler birbirlerinden farklı özelliklere sahiptir. Hücreler ile çalışılmaya başlanmadan önce hücrelerin karakteristik özellikleri bilinmelidir. Hangi hücre soyuna ait oldukları, morfolojilerinin belirlenmesi, sonlu mu sonsuz mu oldukları, malignant özellik taşıyıp taşımadıkları, kültür kabındaki çoğalma yeteneklerine bağlı olarak süspanse veya adherent oldukları, kontaminasyon olup olmadığı, ikilenme zamanları gibi hücrelerin kimliğinin ve özelliklerinin belirlenmesi için karakterizasyon testleri yapılmaktadır.

2.13.1. Sterilite Testleri

Hücre kültürü koşullarında hücreler bakteri, mikoplazma, mantar ve maya gibi mikroorganizmalar tarafından enfekte edilebilmektedir. Bu enfekte durumuna kontaminasyon denmektedir. Oluşan kontaminasyon mikroskobik veya makroskobik olarak incelenebilmektedir. Kontaminasyon hücre kültür koşullarında sıkça karşılaşılan bir problemidir.

Kontaminasyon kaynakları laboratuvardaki işlemlerden ve laboratuvardaki ekipmanlardan dolayı oluşabilmektedir. Ayrıca kültür ortamlarında aynı anda birden fazla hücre ile çalışılması durumunda çapraz kontaminasyonlar oluşabilmektedir. Bu durum hücrelere zarar verebilmekte ve çalışmaların sonuçlarını etkileyebilmektedir. Kültür ortamında oluşabilecek kontaminasyonları önleyebilmek için aseptik teknik kullanılmalıdır. Sterilitesine güvenilen besiyeri ve serumların kullanılması, kullanılan ekipmanların düzenli olarak otoklav veya ışınlama (UV) ile steril edilmesi, yeni hücre hatlarını kültür ortamında kullanmadan önce sterilite testlerinin yapılması ve laboratuvar çalışanlarının dikkatli ve temizliğe özen göstererek çalışması oluşabilecek olası kontaminasyonları önleyebilmektedir [90].

Makroskobik olarak gözlemlenen kontaminasyonlar besiyerindeki pH değişikliğinden kaynaklanan renk değişimleri veya besiyerinin bulanıklaşmasıyla anlaşılabilmektedir. Kültür kabının mikroskop altında incelenmesiyle de bakteriyel kontaminasyonlar tespit edilebilmektedir. Hücre kültürlerinin % 30'dan fazlasının mikoplazma varlığı ile kontamine edildikleri bilinmektedir. Mikoplazmalar 0,3-0,8 µm çapları arasında olup memeli hücrelerin endozomlarında bulunan küçük, yuvarlak veya filamentli ve basit prokaryot hücrelerdir. Küçük boyutlarından dolayı filtreleme sistemlerinden kaçmaları, besiyerlerinde bulanıklık veya renk değişimine neden olmamaları hücre kültüründe yüksek oranda büyümelerinin temel nedenidir. Çoğu bakterinin aksine mikroskopta görünmeyen mikoplazmaların sert bir hücre duvarları yoktur ve bu durum mikoplazma hücre duvarını hedefleyen penisilin ve türevlerine karşı dirençli hale getirmektedir. Enfekte ettikleri konak hücrelerin arjinin amino asitlerini enerji kaynağı olarak kullanarak konak hücreyi bu amino asitten yoksun bırakmaktadırlar. Bu durum nükleik asit öncüllerinin konakçı hücrelerde biraraya gelmesinde aksaklıklar yaratabilmektedir. Mikoplazmal enfeksiyonlar hücre fizyolojisini tehlikeye sokarlar ve çalışmaların hatalı sonuçlar vermesine veya hücre hatlarının kaybına neden olmaktadır. Bundan dolayı kültür çalışmalarından önce hücrelerin mikoplazma ile kontamine olup olmadığı tespit edilmelidir. Hücre kültüründeki mikoplazma kontaminasyonun tespit edilmesi için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar; floresan ile DNA'yı boyanan 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ve Hoechst 33258 boyama, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), mikrobiyolojik kültür (agaroz ve broth kültürü) ve enzime bağlı immünosorbent analizleri (ELISA) ile belirlenebilmektedir.

Mikoplazma kontaminasyon tespitinde pratik, kolay ve hızlı bir analiz olmasından dolayı genellikle DAPI (4',6-diamidino-2 fenilindol) çekirdek boyaması tercih edilmektedir. Enfekte olmuş hücrelerin boyanması ile ekstrasnükleer boyamalar görünmektedir. Hücrelerin büyüme ortamını ele geçiren mikoplazmalar ortamı tüketerek hücrelerin proliferasyonunu inhibe eder ve hücreleri apoptoza sürükleyebilir. Mikoplazma varlığını doğru yorumlamak için iki farklı testin kullanılması önerilmektedir ve deneylere başlamadan önce ve ilerleyen pasajlarda düzenli olarak kontrol edilmelidir [91, 92].

2.13.2. Üreme Eğrisi

Kültür koşullarında kullanılacak hücre hatlarının üreme özelliklerini bilmek önemlidir. Hücreler üreme potansiyellerinde değişiklikler gösterebilmektedir. Farklı karakterlere ve özelliklere sahip olan hücre hatları için kültür koşullarında kullanılan hücre hattına özgü üreme eğrisi oluşturulmaktadır. Hücrelerin iki katına çıkma süresi (T2) bölünmeye hazırlanan hücrenin hücre döngüsünü tamamlaması için geçen ortalama süre olarak belirlenmektedir. Üreme eğrisinin oluşumunda belirgin üreme fazları vardır. Hücreler tripsinizasyon işleminden sonra büyüme ortamlarına bırakıldıkları ilk süreçte lag fazındadırlar. Bu aşamada hücreler bölünmezler ve ekildikleri kültür flasklarına adapte olurlar [93]. Lag fazı genellikle 48 saat kadar sürmekte olup hücrelerin tripsin işleminden sonra toparlanması, hücre iskelet elemanlarının yeniden düzenlenmesi, hücrelerin birbirleriyle bağlanabilmesi için matriksin salgılanması ve hücresel protein miktarının artması için gerekli bir süreçtir. Hücreler normal metabolizmalarına kavuştuklarında üssel faza (log fazı) geçmektedirler. Hücreler bu aşamada aktif olarak çoğalırlar ve üstel bir artış sergilerler. Log fazında her hücre hattı farklı bir çoğalma yeteneği göstermektedir. Bundan dolayı popülasyonun iki katına çıkma süresi bu aşamada belirlenir ve “ikilenme zamanı” olarak adlandırılır. Hücrelerin log fazında hücresel fonksiyonları değerlendirilmektedir. Hücre üremesini inhibe eden veya indükleyen kimyasal maddeler, ilaçlar veya sitotoksikite analizleri hücreler log fazındayken yapılmalıdır. Hücreler geç log fazında yani bulundukları kültür ortamını % 80-90 kadar kapladıklarında pasajlanmaktadır. Pasajlanmanın gecikmesi sayıları artan hücrelerin ortamı tüketmesine ve hücrelerin üst üste çıkmasına ve de apoptoza neden olabilmektedir. Son aşamada hücrelerin kültür flasklarını kaplama yoğunluğunun artmasıyla birlikte üreme hızları sıfıra kadar düşmektedir ve canlılıkları hassas bir sürece girmektedir.

Besin ortamının tükenmesinden dolayı hücreler durağan (plato) fazına geçerler. Durağan fazdaki ortamın besiyeri tazelenmezse ya da hücreler flasklardan tripsin ile kaldırılarak sayıları azaltılmazsa hücreler ölüme gider ve canlı hücre sayısında azalmalar meydana gelir [94-96].

Hücre canlılığı ile birlikte genetik ve fenotipik stabilite için hücre hatlarının log fazında korunması gerekmektedir. Bu aşamanın korunması için flastaki hücrelerin % 100 konfluente gelmeden önce düzenli olarak pasajlanarak alt kültüre ayrılmalrı sağlanmalıdır.

2.14. Sitotoksisite Testleri

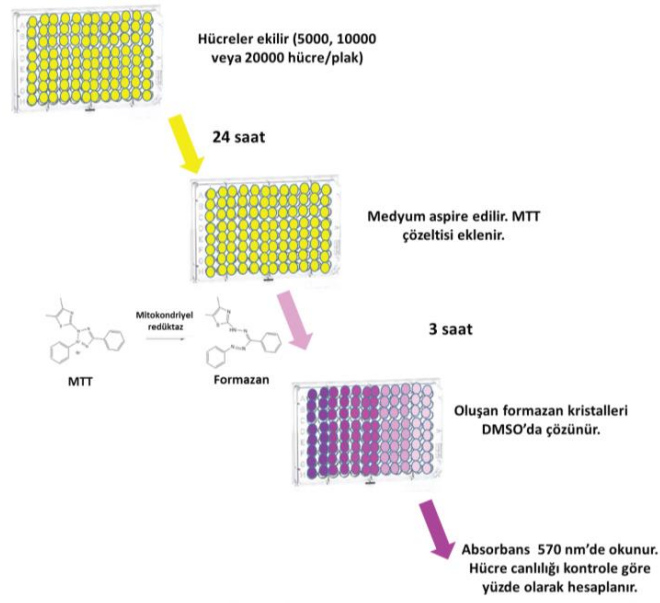
Kültür ortamındaki hücrelerin canlılık seviyeleri ve çoğalma yetenekleri hücre kültürünün sağlıklı olduğunu göstermektedir. Kültürdeki kimyasal veya fiziksel ajanlar hücre zarında bozulmalara ve protein sentezlenmesinde aksaklıklara neden olarak hücrenin temel fonksiyonlarını etkilemektedir. Sitotoksisite etkisi, hücre metabolizmalarında değişikliklere yol açarak apoptoz veya nekroza neden olan sinyal yollarını indükleyebilirler. *In vitro* hücre canlılığı ve sitotoksisite analizleri, ilaç ve kimyasalların toksisitelerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu testler ile toksik bileşik konsantrasyonu, hücrelerin büyüme aktiviteleri, koloni boyutlarındaki değişimler tespit edilebilmektedir. Hücre zarındaki hasar, mitokondriyal veya lizozomal aktivitelerdeki bozulmalar, adenosin trifosfat (ATP) üretimindeki değişiklikler, protein ve enzim aktivitesi gibi hücrelerin çeşitli fonksiyonları sitotoksisite testleri ile belirlenebilmektedir. Sitotoksisite ve hücre canlılığını ölçmek için birden fazla test kullanılmaktadır. Bu testler hücre zarı hasarlarında ölü hücrelerin boyandığı tripan mavisi, kolorimetrik ölçüm ile mitokondriyal aktivitenin belirlenmesinde 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT), lizozomal aktivitenin belirlenmesinde ise laktat dehidrojenaz (LDH) enzim analizi, florometrik ölçümlerde alamar Blue (AB) testi, ATP miktarının belirlenmesi ve lüminometrik testler olabilmektedir [96-100]. Hücre canlılığı bu analizlere yanıt olarak renk geliştirir ve renk değişimleri spektrofotometre aracılığıyla ölçülmektedir. Ölçümler sonucunda elde edilen absorbans değerleri ile hücre canlılığı ve kimyasalların sitotoksisitesi belirlenmektedir.

2.14.1. MTT Hücre Canlılık Testi

Kolorimetrik testler hücrelerin metabolik aktivitelerini ölçmek için biyokimyasal reaktiflerin kullanılması esasına dayanmaktadır. Bu testler metabolik aktivitenin ölümüne bağlı olarak hücre ölümünü veya proliferasyonunu belirlemektedir. 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT) hücre canlılığı ve sitotoksite değerlendirmelerinde sıkça tercih edilen kolorimetrik testlerden biridir.

MTT sadece *in vitro* ortamda sadece hücre ile değil doku kültürlerinde de kullanılmaktadır. MTT testi hücrelerin mitokondriyal aktivitesini ölçerek hücrelerdeki mitokondriyal fonksiyonu ve hücre canlılığını belirleyen güvenilir, hassas ve hızlı bir yöntemdir. Suda    nebilir sarı renkli olan MTT bir tetrazolyum tuzudur. Canlı hücrelerin artan proliferasyonları ile mitokondriyal dehidrogenaz enzimlerinin aktiviteside artarak tetrazolyum tuzlarını suda    nmeyen formazan tuzlarına d n  tirmektedir. Oluşan formazan kristalleri hücre canlılığına bağlı olarak açık veya koyu mor renkte değişim göstermektedir. Tetrazolyum tuzu ile yapılan sitotoksite analizinde ilk olarak hücreler toksik bir maddeye belirli bir süre maruz bırakılırlar. Sonrasında toksik madde hücrelerden uzakla tır ve tetrazolyum bileşiği eklenerek karanlıkta 1-4 saat boyunca 37  C etüvde inkübasyona bırakılır. Bu aşamada canlı hücreler tetrazolyum tuzlarını indirgeyerek formazana dönüştürür ve renk değişimi meydana gelir. Formazan kristalleri mor renkte olup suda    nmezler. Bundan dolayı uygun bir    c  olan dimetil sülfoksit (DMSO)/Amonyak (% 95 DMSO, % 5 Amonyak)   zeltisi ile oluşan formazan kristalleri çözdürülür. Son olarak renk değişimleri spektrofotometrik yöntem (ELISA) ile  l  l rek canlı/ l  hücre sayısı belirlenmektedir. MTT testi şematik olarak  ekil 2.11’de gösterilmiştir [98, 100, 101]. Hücre canlılığı ve sitotoksite çalışmalarının ölçüm sonuçları hücre tipine, sayısına, metabolik aktivitesine, ortamın pH değerine, büyüme fl skları gibi koşullara göre değişiklik gösterebilmektedir [101].



Şekil 2.11. MTT hücre canlılık testinin şematik gösterimi [101].

2.15. İnsan Koryonik Gonadotropin Hormonu (β -hCG)

Embriyonun implantasyonundan itibaren sinsityotrofoblast hücrelerine farklılaşan trofoblast hücreleri tarafından gebelik hormonu olarak bilinen insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu üretilmektedir. hCG, kovalent olmayan iyonik ve hidrofobik etkileşimlerle bir arada tutulan 237 aminoasitlik glikoprotein yapısındaki iki farklı α (14 kDa) ve β (23.5 kDa) alt biriminden oluşan bir hormondur.

hCG hormonun moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 37.5 kDa'dır. İnsan koryonik gonadotropinin, korpus luteal hücrelerini uyarak progesteron salgılanmasını teşvik etmesi bu hormonun ana işlevi olarak varsayılmıştır. hCG, implantasyon sonrası 3-4 hafta boyunca aktif bir şekilde progesteron üretimini teşvik etmektedir. Yapılan son yıllardaki çalışmalarda, hCG'nin hamilelikte önemli olan plasental, uterus ve fetal işlevlerde de yer aldığı bilinmektedir. hCG, hamilelikte uterus damar sisteminde anjiyogenez ve vaskülojenezi teşvik ederek plasentaya yüksek düzeyde kan geçişini ve fetüsün optimal beslenmesini sağlamaktadır. hCG hormonunun, sitotrofoblast hücrelerinin farklılaşması, göbek kordonu büyümesi ve gelişmesindeki işlevi, fetal büyümeye bağlı olarak rahim ve uterus büyümesi, fetal organların farklılaşması ve gelişimi, utero-plasental bağışıklık tepkisi ve makrofaj fagositozunu inhibe etmesi bilinen işlevlerindendir. İdrar ve serum hCG düzeylerinde artışın saptanması gebelik tanısı için kullanılmaktadır [102-106].

2.16. Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2)

Hamileliğin oluşmasıyla birlikte uterus endometriyumunda yapısal olarak bazı değişikliklerin meydana gelmesi gerekmektedir. İmplantasyon ve plasentasyon, trofoblast hücrelerinin endometriyumu istila ederek hücre dışı matriksin (HDM) bozulması ve yeniden şekillenmesiyle hücre hareketliğinin aktif olduğu bir süreçtir. Matriks metalloproteinaz (MMP) enzimleri, plasentasyon sırasında trofoblast hücrelerinin penetrasyonundan sorumludur. Uterusun trofoblast hücreleri ve vasküler hücreler MMP'lerin ana kaynaklarıdır. MMP ailesinin bir üyesi olan MMP-2, HDM ve bazal membranın bazı bileşenlerini parçalayabilen ve aktif bölgelerinde çinko barındıran bir endopeptidazdır. MMP-2, 27 kb uzunluğuna sahip, kromozom 16 üzerinde 12.2 konumunda yer alan bir gen tarafından kodlanan enzimdir [107-109]. İnsanlarda MMP-2 geni tarafından kodlanır. Hücre içi MMP-2 sitozolde, çekirdek ve mitokondri dahil organellerde de bulunmaktadır. MMP-2, hamileliğin başlangıcında ve devamında önemlidir. Embriyonik gelişimde meydana gelen vaskülogenez ve anjiyogenez için temel bir proteindir. MMP-2 aktivitesi çeşitli vücut fonksiyonlarında menstrüasyon sırasında endometriyal dokunun parçalanması ve onarılmasında fayda sağlamaktadır. MMP-2'ler bazal membranda bol bulunan tip IV kollajeni parçalayabilirler. Bazal membran, doku bütünlüğünü sürdürmek, hücre sinyalleşmesini hücrelere destek sağlamak açısından önemlidir. Bazal membran degradasyonu ise çoğu kanserin metastatik ilerlemesinde önemlidir. MMP-2'nin tümörlerdeki ekspresyonu bilinmektedir. Hamilelikte trofoblast hücreler ve desidual dokulardan üretilen matriks metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP'ler), aktif MMP'nin çinko bölgesine bağlanarak MMP'lerin aktivitesini inhibe etmektedir. Böylelikle aşırı trofoblast istilasını sınırlandırılarak HDM parçalanması dengede tutulmaktadır. MMP-2'ler istila ve yeniden şekillenme süreçlerindeki büyük bir öneme sahiptirler [110-112].

2.17. Matriks Metalloproteinaz-9 (MMP-9)

Embriyo implantasyonu, blastosistin trofoblast hücreleri yardımıyla endometriuma yapışmasına ve bölgeyi istila etmesine dayanmaktadır. Hamileliğin başlangıcında, devamında ve plasentasyonunda trofoblast hücrelerinin endometriuma istilasının süreç boyunca düzenli bir şekilde devam etmesi gerekmektedir [113]. Trofoblast hücreleri, sitokinler ve sinyal yolları tarafından proliferasyona uğrayarak sayılarını arttıırırlar ve trofoblast tiplerine farklılaşarak endometriuma yerleşirler.

Proliferasyon ve farklılaşmada hormonlar, hücre adezyon molekülleri, hücre dışı parçalayıcı matriks proteinazları ve bağışıklık hücreleri ile birlikte parakrin ve otokrin faktörlerle hücrelerel olayları içeren bir süreçtir. HDM bileşenlerini parçalayan matriks metalloproteinaz ailesinden matriks metalloproteinaz 9 (MMP-9), dokunun yeniden şekillenmesinde ve onarılmasında görev yapan çinko bağımlı endopeptidazdır. MMP-9 yoğun olarak blastokistlerden salgılanmaktadır ve ekspresyonu blastokistlerin istilasının yaklaşık olarak 6.gününde başlamaktadır [114]. Matriks metalloproteinaz 9, jelatinaz B veya 92 kDa jelatinaz ve 92 kDa tip IV kollajenaz olarak da bilinmektedir [115]. MMP-2 ve MMP-9, katalitik alanlarında fibronektin tipi II'nin tekrarına sahiptirler. Bu tekrarların kolajen ve jelatinlerle etkileşime girdiği bilinmektedir [116]. Yapısında O-glikanları ve N-glikanları içermektedir [117]. Embriyonik gelişim, endometriyal döngü, anjiyogenez, yara iyileşmesi, kemiğin şekillenmesi gibi normal biyolojik süreçler MMP-9'ların görevleri arasındadır [113]. MMP-9'un epitelyal rejenerasyon sürecinde önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Artan MMP-9 ekspresyonu, fetal ve bazal membranlarının HDM yapısının bozulmasına sebep olabilir ve bu durum sonucunda fizyolojik ve patolojik olarak hasarlar meydana gelebilmektedir [114, 116, 118-121].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Madde ve Malzemeler

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan 25 cm² (Greiner Bio-One, 690175) ve 75 cm² (Greiner Bio-One, 658175) filtreli flasklar, hücrelerin yüzeyden kaldırılmasında kullanılan Tripsin/EDTA (% 0,25) (Thermo Fisher, 25200056), hücre sayımı için Tripan mavisi (Biochrome, L6323), 6 gözlü (Greiner Bio-One, 657160), 48 gözlü (Greiner Bio-One, 677180), 24 gözlü (Greiner Bio-One, 662160) ve 96 gözlü (Greiner Bio-One, 655180) hücre kültür plakları, fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) (Thermo Fisher, 003002), sterilite analizinde kullanılan DAPI (Sigma, D9542) ve DAPI'lı Mounting Medium (Abcam, Ab104139), glasyal asetik asit (Carlo Erba, 64-19-7), metanol (Sigma, M10609), toksisitesi incelenen Vortiooksetin-hidrobromid (Cayman, 23695), canlılık analizinde kullanılan 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]difenilterazolyum bromür (MTT) (Acros organics, 158990010), Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Applichem, 01A3672, 0100), Amonyak (Merck, K13391922) firmalarından temin edilmiştir.

Kriyojel sentezlenmesinde ve analizlerinde kullanılan 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA) (Sigma, 477028), poli (etilen glikol) diakrilat (PEGDA) (Sigma, 475629), amonyum persülfat (APS) (Sigma, A9164), N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED) (Sigma, T9281), jelatin (domuz derisinden, Tip A) (Sigma, G2500), gluteraldehit (% 25'lik) (Merck, 820.603), kriyojellere HDM elemanları olarak bağlanan fibronektin (FN) (Sigma, ECM001), folik asit (FA) (Sigma, F8758) ve kolajen tip IV (KOL Tip IV) (Sigma, C7521), SEM analizlerinde kullanılan etanol alkol (Merck, 1.00983.2511), hekzametildisilazan (HMDS) (Merck, 8.04324.0250) temin edilmiştir.

ELISA analizlerinde kullanılan Human Folic Acid ELISA Kiti (Bioassay Technology Laboratory, EA0051Hu, China), MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit (Lonza, LT07-118), Human (Chorionic Gonadotropin) (β-hCG) ELISA Kit (Elabscience, E-EL-H0175), Human MMP-2 (Matriks Metalloproteinaz-2) ELISA Kit (Elabscience, E-EL-H1445) ve Human MMP-9 (Matriks Metalloproteinaz-9) ELISA Kit (Elabscience, E-EL-H6075) temin edilmiştir.

3.2. Hücre Kültür Koşulları

Hücre kültür çalışmalarında kullanılmak üzere insan plasenta koryokarsinom hücre hattı Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu'ndan (BeWo, CCL-98™, ATCC®, Manassas, Virginia Eyaleti, Amerika Birleşik Devletleri) temin edildi. İnsan göbek kordonu ven endotel hücreleri ise (HUVEC, CRL-1730, ATCC®) laboratuvarımızda mevcut olup deneylerde kullanmak üzere hücre stokları hazırlanmıştır. Bu çalışmada ikilenme süreleri farklı olan iki hücre ile ortak kültür oluşturulmuştur. BeWo hücreleri 25-30, HUVEC hücreleri ise 15-20 pasaj aralığında kullanıldı.

3.2.1. BeWo ve HUVEC Hücrelerinin Pasajlanması

BeWo hücreleri Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Ham's F-12 (1:1) (DMEM F-12) ortamı içerisinde Cegrogen Biotech (Stadtallendorf, Almanya), % 10 fetal sıgır serum (FSS) Cegrogen Biotech (Stadtallendorf, Almanya) ve 100 U penisilin/100 µg streptomisin antibiyotik (Capricorn, Scientific) ile desteklenerek üretildi. HUVEC hücreleri ise Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Ham's (1:1) (DMEM) ortamında Cegrogen Biotech (Stadtallendorf, Almanya), % 10 fetal sıgır serum (FSS) Cegrogen Biotech (Stadtallendorf, Almanya) ve 100 U penisilin/100 µg streptomisin antibiyotik (Capricorn, Scientific) ile üretilmiştir.

Hücrelerin ortak kültür edildikleri besiyerinin hazırlanmasında bazal ortamların besin içerikleri değerlendirildi. DMEM F-12 bazal ortamı besin içeriği açısından daha zengindir. Ortak kültür çalışmaları öncesinde HUVEC hücresi DMEM F-12 besiyerinde üretilerek ortama uyumu sağlanmıştır. HUVEC hücrelerinin BeWo ile aynı besi ortamında üretilerek ortak kültürleri yapılmıştır. Hücreler flasklarda % 80-90 kapasiteye ulaştıklarında tripsinizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin içinde bulundukları flasklardan atık besiyeri aspire edildi. Kalan besiyerini ortamdan uzaklaştırmak için 3 mL fosfat tamponlu salin (PBS) ile ortam yıkandı. Hücrelere adherent özellik göstererek yapıştıkları yüzeyden ve birbirlerinden ayırmak için Tripsin/EDTA uygulandı. 75 cm²'lik flasklarda üretilen BeWo ve HUVEC hücreleri için 2 mL Tripsin/EDTA ile 2 kere yıkama işlemi yapılmıştır. Flask içerisinde süspanse hale gelen hücrelerin üzerine önceden 37°C'lik su banyosunda ısıtılmış besi ortamları eklenmiştir ve pipetaj işlemi yapılmıştır. Hücre süspanسیونları yeni flasklara bölünerek taze besi ortamları ilave edilmiştir. Hücrelerin deneylerde kullanılmak üzere üretimi % 5 CO₂ nem koşullarında ve 37°C sıcaklıktaki etüvde gerçekleştirildi.

3.2.2. BeWo ve HUVEC Hücrelerinin Dondurulması ve Çözdürülmesi

Hücre stoklarının depolanabilmesi ve aynı pasaj numarasına ait hücrelerin deneysel çalışmalarda kullanılabilmesi için dondurma işlemi gerçekleştirilmektedir. Uzun süreli depolama işlemi için sıvı azot tankları (-196°C) tercih edilmektedir. Hücrelere mekanik olarak zarar vermeden dondurarak saklayabilmek için kriyoprotektan maddeler kullanılmaktadır. Kriyoprotektan maddeler hücre içi buz kristallerinin oluşumunu engelleyerek hücreyi mekanik hasardan korurlar ve hücre membranını stabilize etmektedirler. Hücreleri dondurmak için dondurma vasatı adı verilen solüsyon kullanılmaktadır. Dondurma solüsyonun içeriği kriyoprotektan bir madde olan DMSO ve FSS oluşmaktadır

Hücre kültürleri logaritmik (log) fazda bulundukları evredeyken dondurulmalıdır. Hücreler bulundukları kültür kabını % 80-90 kadar kapladıklarında dondurma işlemi gerçekleştirilmektedir. Tripsinizasyon işlemi ile hücreler yapışık oldukları flask yüzeyinden kaldırılmıştır. Süspanse hale getirilen hücreler santrifüj tüpüne aktararak 5 dakika 800 rpm hızda (Eppendorf Centrifuge, 5810R) santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmıştır. Elde edilen hücre peleti önceden hazırlanmış olan dondurma vasatı (% 90 FSS, % 10 DMSO) ile bir araya getirilerek pipetajı yapılmıştır ve 1 mL olacak şekilde kriyotüplere paylaştırılmıştır. Hücre ile ilgili bilgiler kriyotüplerin üzerine yazılmıştır. Hücrelerin kademeli dondurulması için kriyotüpler ilk olarak -80°C 'de tutulmuştur. 1-2 gün sonra kriyotüpler sıvı azot tankına aktarılmıştır.

Deneysel çalışmalarda kullanabilmek için -196°C sıvı azot tankından çıkarılan hücrelerin 37°C 'lik su banyosunda 2-3 dakika çözülmesi sağlanmıştır. Çözünen hücreler 5 dakika 800 rpm hızda santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak elde edilen hücre peletinin üzerine önceden su banyosunda ısıtılmış olan besi ortamı eklenmiştir ve pipetaj yapılmıştır. Hücreler içerisinde besi ortamı bulunan 75cm^2 'lik kültür flasklarına aktararak % 5 CO_2 ve 37°C sıcaklıktaki etüve (Sanyo, MCO18AC) kaldırılmıştır. Hücrelerin besi ortamı 2 günde bir değiştirilmiştir.

3.3. Mikoplazma Testi

Bu tez kapsamında kullanılacak BeWo ve HUVEC hücrelerinin kültürlerinde kontaminasyon olup olmadığını belirleyebilmek amacıyla mikoplazma testi yapılmıştır. BeWo hücresi mikoplazmanın test edilmesi için 3 pasaj antibiyotiksiz besiyeri ile pasajlanmıştır.

- BeWo hücrelerinin sayısı 1×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 6 gözlü hücre kültür plakalarına ekilmiştir ve 48 saat boyunca % 5 CO₂ ve 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonrası besiyeri ortamdan aspire edilerek uzaklaştırılmıştır ve kuyucuk başına 2 mL Carnoy’s fiksatif (asetik asit/metanol; 1/3) eklenerek hücreler 3 dakika oda sıcaklığında fikse edilmiştir.
- Carnoy’s fiksatif aspire edilmiştir. Hücreler 2 mL PBS ile 2 dakika bekletilerek yıkanmıştır.
- Hücrelere 300 nM DAPI boyası eklenerek karanlıkta 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası hücreler PBS ile 3 kere yıkanmıştır.
- Yıkama sonrası hücrelerin üzerine DAPI’lı Mounting Medium damlatılarak kapanma işlemi gerçekleştirilmiştir.
- BeWo hücrelerindeki mikoplazma varlığı floresan mikroskopta (Olympus CKX41, Japan) incelenmiştir.

HUVEC hücrelerinin mikoplazma testi için hizmet alımı yapılmıştır. MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit (Lonza, LT07-118) kullanılarak üreticinin belirtmiş olduğu protokol uygulanmıştır.

- HUVEC hücresi 25 cm²’lik kültür flasklara ekilmiştir ve üzerine 5 mL besiyeri eklenmiştir. Besiyerinin rengi sarıya dönünceye kadar ortam değiştirilmemiştir.
- Besiyerinin rengi sarıya döndükten sonra ortamdan 2 mL alınarak santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Kültür süpernatantı 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası süpernatantın 100 µL lüminometre kuyucuğuna aktararak üzerine 100 µl MycoAlert™ Reaktif eklenmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Kuyucuk lüminometreye yerleştirilmiş ve program başlatılmıştır (Okuma A).
- Kuyucuğa 100 µl MycoAlert™ Substrat eklenmiş ve 10 dakika bekletilmiştir. Kuyucuk lüminometreye yerleştirilmiş ve program başlatılmıştır (Okuma B).
- Okuma Biotek Synergy H1 cihazında yapılmıştır. B/ A oranı ile hesaplanmıştır.

3.4. Hücrelerin İkilenme Zamanlarının Hesaplanması

BeWo ve HUVEC hücrelerinin üreme karakterlerini belirleyebilmek için mono kültürlerde üreme eğrisi oluşturulmuştur ve ikilenme süreleri hesaplanmıştır.

- BeWo ve HUVEC hücreleri için hücre sayısı 5×10^4 hücre/mL olarak belirlenmiştir ve 6 gözlü hücre kültür plaklarına kuyucuk başı 2 mL hücre süspansiyonu gelecek şekilde ekilmiştir. Hücreler % 5 CO₂ ve 37°C sıcaklıktaki etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Hücre sayımına 10 gün boyunca 2 tekrarlı olarak devam edildi.
- İlk gündeki hücre sayımı için t₀ (0.gün) kabul edilerek 2 kuyucuğun 4 saat etüvde inkübe edilmesinden sonra hücre sayımı yapılmıştır.
- Besiyeri aspire edilerek ortamdan uzaklaştırılmıştır ve kuyucuk başına 1 mL Tripsin/EDTA eklenerek hücrelerin yüzeyden kaldırılması sağlanmıştır. Süspanse hale gelen hücrelerin üzerine besiyeri eklenmiştir. Hücre süspansiyonuna sayım için tripan mavisi eklenerek Bürker lamında hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. 2 kuyucukta sayılan hücrelerin ortalaması t₀ olarak kabul edilmiştir.
- Kalan hücrelerin 2 günde bir besiyerleri değiştirilmiş ve 10 gün boyunca her gün aynı saatte sayım işlemi aynı yöntem ile gerçekleştirilmiştir.

3.5. Vortioksetin Stok Çözeltilisinin Hazırlanması

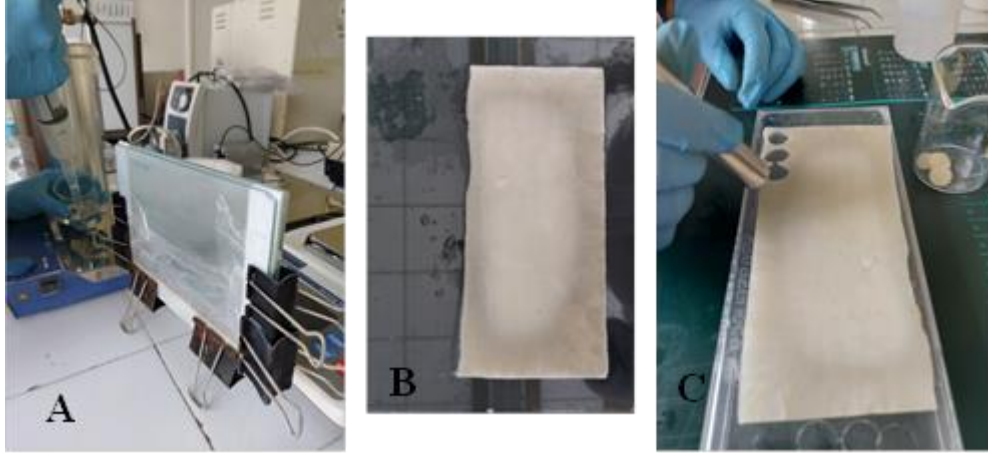
Çalışmada kullanmak üzere liyofilize halindeki etken madde olan 5 mg'lık Vortioksetin (Cayman, Amerika) 1 mL DMSO içerisinde çözülerek ana stok çözeltisi (13100 µM) elde edilmiştir. Yapılan ön çalışmalar ile elde edilen sonuçlara göre Vortioksetinin 2, 4 ve 7.günler için seçilen dozları ana stoktan hazırlanan ara stok çözeltisinden serumsuz besiyeri ile dilüe edilerek hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılacak dozları belirlemek için ön çalışmalar yapılmıştır ve uygulamada kullanılacak dozlar 30 µM ve 60 µM olarak seçilmiştir. Vortioksetinin çözücüsü olarak kullanılan DMSO'nun besiyerindeki son konsantrasyonu en fazla % 0,1 olacak şekilde seyreltilmiştir.

3.6. Fibronektin/Kolajen Tip IV'ün Yapıya Katılarak PHEMA Temelli Kriyojellerin Sentezlenmesi ve Folik Asit Bağlanması

3.6.1. PHEMA Kriyojel Sentezi

PHEMA temelli kriyojellerin sentezi için monomer olarak 1,5 mL HEMA ve çapraz bağlayıcı olan 0,5 mL Poli etilen glikol diakrilat (PEGDA) 10 mL ultra saf su içerisine eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürülmüştür. Çözeltinin buz banyosu içerisinde soğutulması sağlanmıştır. Daha sonra karışıma polimerizasyon başlatıcıları olan 20 mg amonyum per sülfat (APS) ve 25 µl N,N,N',N'-tetrametilen diamin (TEMED) ilave edildi ve polimer çözeltisi önceden soğutulmuş olan 2,5 mm çapındaki cam kolonlara döküldü. Kolonlar hızlıca -18°C'ye kaldırılarak 24 saat boyunca polimerizasyona bırakıldı. Bu aşamada polimer çözelti içerisindeki çözücü olan su donarak buz kristalleri oluşturmuştur. Kolonlar 24 saatin sonunda oda sıcaklığına çıkartıldı ve buz kristallerinin erime aşaması gerçekleştirildi. Polimer çözeltisinde çözücü olarak kullanılan suyun erimesiyle birbirleriyle bağlantılı makro gözenekler oluşturuldu. Kriyojeller, yapıya girmeyen polimer öncüllerini ortamdan uzaklaştırmak için distile su ile birkaç kez yıkandı. Jeller 12 mm çapında 24 gözlü hücre kültür plakalarına uygun olacak şekilde kesilmiştir ve kesilme işleminden kaynaklı olarak kriyojellerin yüzeyinde kalan parçacıkların uzaklaştırılması için birkaç kez distile su ile yıkanmıştır.

Bu tez kapsamında PHEMA ile birlikte jelatin içeren (PHEMAGEL) kriyojeller de hazırlanmıştır. PHEMAGEL sentezi için yukarıda verilen yöntem izlenmiştir. Polimerizasyon işlemine başlamadan önce 0,2 g jelatin 10 mL ılık ultra saf su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürüldü. Jelatin içeren kriyojellerin sentezinden önce çözelti oda sıcaklığında soğutulduktan sonra çözeltiye çapraz bağlayıcılar, monomerler ve polimerizasyon başlatıcı malzemeler eklenmiştir. Jelatin için çapraz bağlayıcı olan % 25'lik gluteraldehit 20 µl çözeltiye eklenmiştir. Aşağıda verilen Şekil 3.1'de kriyojellerin sentezlenme aşamaları, Şekil 3.2'de ise PHEMA ve PHEMAGEL kriyojellerin kesilmiş görüntüsü verilmiştir.



Şekil 3.1. A. Polimer çözeltisinin önceden soğutulmuş iki cam kolon arasına dökülmesi, B. 24 saat sonra buz kristallerinin erimesi için oda sıcaklığına çıkartılan kesilmemiş PHEMAGEL kriyojel, C. PHEMAGEL kriyojelin 9 nolu kesici ile disk şeklinde kesilmesi gösterilmiştir.



Şekil 3.2. PHEMA (beyaz) ve PHEMAGEL (sarı) kriyojellerin kesilmiş disk görüntüsü.

3.6.2. Fibronektin/Kolajen Tip IV'ün Kriyojel Yapısına Katılması ve Folik Asit Bağlanması

PHEMA ve PHEMAGEL olarak iki farklı kriyojel grubu sentezlenmiştir. Bu kriyojellerden PHEMAGEL'in yapısına folik asit ile fibronektin (FA-FN) ve PHEMA jelin yapısına ise folik asit ile birlikte kolajen tip IV (FA-KOL tip IV) bağlanmıştır. Böylece toplamda birbirinden farklı 8 kriyojel grubu oluşturulmuştur. PHEMA ve PHEMAGEL kriyojellerin yapısına katılacak olan protein molekülleri FN ve KOL Tip IV kriyojellerin polimerizasyon çözeltisine eklenmiştir.

Bu sayede protein moleküllerinin direkt jel yapısına katılmaları sağlanmıştır. FA ise kriyojellerin sentezlenmesi sonrasında kesilen diskler folik asit çözeltisinde 24 saat boyunca çalkalayıcı üzerinde bağlanmaya bırakılmıştır.

PHEMA kriyojelin yapısına KOL tip IV proteinini bağlayabilmek için 10 mL ultra saf su içerisine monomer olarak 1,5 mL HEMA ve çapraz bağlayıcı olarak 0,5 mL PEGDA buz banyosu içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürülmüştür. Karışıma KOL Tip IV (Sigma, Amerika) ekleyebilmek için liyofilize halindeki kolajen 0,5 M asetik asit (1 mg/mL) içerisinde çözündürülmüştür ve 100 µL kolajen 20 µL gluteraldehit (% 25'lik) ile birlikte polimerizasyon çözeltisine eklenmiştir. Çözünen karışımın içerisine polimerizasyon başlatıcıları 20 mg APS ve 25 µL TEMED eklenmiştir. Polimer çözeltisi iki cam kolon arasına dökülerek -18°C sıcaklıkta 24 saat boyunca polimerizasyona bırakıldı. Sonrasında oda sıcaklığında erimeye bırakılan PHEMA+KOL Tip IV kriyojeller birkaç defa distile su ile yıkanmıştır. PHEMA+KOL Tip IV kriyojelin sentezi yukarıda belirtildiği şekilde başarıyla gerçekleştirildi [34].

PHEMAGEL kriyojelin yapısına fibronektin proteinini bağlayabilmek için öncelikle 10 mL ılık ultra saf su içerisinde 0,2 g jelatin çözündürülmüştür. Çözelti oda sıcaklığında soğutulduktan sonra monomer olarak 1,5 mL HEMA ve çapraz bağlayıcı olarak 0,5 mL PEGDA eklenmiştir ve manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürülmüştür. Liyofilize halinde olan 200 µg fibronektin (Sigma, Amerika) 1 mL ultra saf su ile çözündürülerek çözünen polimerizasyon karışımı içerisine 125 µL fibronektin ve çapraz bağlayıcı olan 20 µL gluteraldehit (% 25'lik) ilave edilmiştir. Devamında polimer çözeltisine polimerizasyon başlatıcıları olan 20 mg APS ve 25 µL TEMED eklenmiştir ve polimer çözeltisi iki cam kolon arasına dökülerek -18°C sıcaklıkta 24 saat polimerizasyona bırakılmıştır. Polimerizasyon sonrasında oda sıcaklığında erimeye bırakılan PHEMAGEL+FN kriyojeller birkaç kez distile su ile yıkandı. Böylece yapıya katılamayan bileşenlerin uzaklaştırılması sağlandı. Kriyojellere folik asit bağlanmasının hücreler açısından daha etkili ve uyumlu olabilmesi için PBS ile bağlanma yöntemi kullanıldı. Farklı özellikler ile sentezlenmiş olan PHEMA, PHEMAGEL, PHEMA+KOL tip IV, PHEMAGEL+FN kriyojeller 24 gözlü hücre kültür plakalarına uygun olacak şekilde 9 nolu kesici yardımıyla disk şeklinde kesildi.

Öncelikle kriyojel diski başına 11,6 mg folik asit 20 mL 1X PBS tamponu içerisinde 2 saat boyunca çözdürüldü. Sonrasında kriyojel diskler distile su ile yıkandı ve folik asit çözeltisi içerisine aktarıldı. 150 rpm hız ile çalışan çalkalayıcıda (Heidolph, Rotamax 120) 24 saat boyunca adsorpsiyona bırakıldı.

Adsorpsiyon sonrası kriyojeller folik asit kalıntılarını uzaklaştırmak için PBS ile yıkandı. Böylece dört farklı kriyojel grubu (PHEMA+FA, PHEMAGEL+FA, PHEMAGEL+FA+FN ve PHEMA+FA+KOL tip IV) elde edilmiştir. Daha sonra kriyojel diskler 1'er saat arayla iki kere 7,5 mL ultra saf su ile yıkandı. Ayrıca, kriyojel disklere bağlanmış olan FA molekülünün miktarını bağlanma öncesi ve sonrası ELISA ile ayrı ayrı ölçüp belirleyebilmek için örnekler alındı. Farklı özellikler ile hazırlanmış olan kriyojel gruplarının içeriklerinin daha iyi bir şekilde anlaşılabilmesi için kriyojellerin içerikleri Çizelge 3.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1. Tez kapsamında sentezlenen kriyojel gruplarının içerikleri.

Grup Adları	PHEMA	Jelatin	Folik Asit	Fibronektin	Kolajen Tip IV
PHEMA	+	-	-	-	-
PHEMA+FA	+	-	+	-	-
PHEMA+KOL Tip IV	+	-	-	-	+
PHEMA+KOL Tip IV+FA	+	-	+	-	+
PHEMAGEL	+	+	-	-	-
PHEMAGEL+FA	+	+	+	-	-
PHEMAGEL+FN	+	+	-	+	-
PHEMAGEL+FN+FA	+	+	+	+	-

FA: Folik Asit FN: Fibronektin KOL Tip IV: Kolajen Tip IV GEL: Jelatin

3.7. Sentezlenen Kriyojellerin Karakterizasyon Çalışmaları

Farklı özellikler ile sentezlenmiş olan PHEMA, PHEMA+KOL IV, PHEMAGEL ve PHEMAGEL+FN kriyojellerin karakterizasyon çalışmaları için şişme deneyleri, fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) analizi, mikro bilgisayarlı tomografi (Mikro-CT) ve taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi yapılmıştır.

3.7.1. Şişme Testleri

3.7.1.1. Makro gözeneklilik derecesi

Kriyojellerin makro gözeneklilik derecesini hesaplayabilmek için jellerin şişmiş ve sıkıştırılmış ağırlıkları ölçülmüştür. Şişmiş jel ağırlığı için kriyojeller su içerisinde bekletilmiştir ve daha sonra ($m_{\text{şişmiş jel}}$) tartılmıştır. Sıkıştırılmış jel ağırlığını ölçebilmek için kriyojellerin yapısındaki su uzaklaştırılmıştır ve ($m_{\text{sıkılmış jel}}$) tartılmıştır. Makrogözenek miktarını (%) hesaplamak için Eşitlik 1 kullanılmıştır [39].

$$\text{Makrogözenek miktarı (\%)} = (m_{\text{şişmiş jel}} - m_{\text{sıkılmış jel}}) / m_{\text{şişmiş jel}} \times 100$$

3.7.1.2. Jelleşme verimi

Kriyojellerin jelleşme verimini anlayabilmek için şişmiş olan kriyojeller 50°C'deki etüvde kurutulmuştur ve kuru ağırlığı ($m_{\text{kuru jel}}$) tartılmıştır. Jelleşme verimini hesaplamak için Eşitlik 2 kullanılmıştır [39].

$$\text{Jelleşme verimi (\%)} = (m_{\text{kuru jel}} / m_t) \times 100$$

Ek olarak bu eşitlikteki m_t ; polimer çözeltisinde toplam monomer kütlesini ifade etmektedir.

3.7.1.3. Şişme oranı

Kriyojellerin şişme oranını hesaplayabilmek için şişmiş ve kuru ağırlıkları ölçülmüştür. Şişmiş ağırlığı ölçmek için kriyojeller su içerisinde bekletilmiş ve ($m_{\text{şişmiş jel}}$) ağırlığı tartılmıştır. Kuru ağırlık için kriyojeller 50°C etüvde kurutulmuş ve ($m_{\text{kuru jel}}$) tartılmıştır. Şişme oranını hesaplamak için Eşitlik 3 kullanılmıştır [39].

$$\text{Şişme oranı (\%)} = (m_{\text{şişmiş jel}} - m_{\text{kuru jel}}) / m_{\text{kuru jel}} \times 100$$

3.7.1.4. Şişme derecesi

Kriyojellerin şişme derecesinin hesaplanabilmesi için jellerin ıslak ve kuru ağırlıkları ölçülmüştür. Deiyonize su ile kriyojellerin şişmesi sağlanmış ve yüzeyinde kalan fazla su uzaklaştırılarak ($m_{\text{ıslak jel}}$) tartılmıştır.

Kuru ağırlık için kriyojeller 50°C etüvde kurutulmuş ve ($m_{\text{kuru jel}}$) tartılmıştır. Şişme derecesini hesaplamak için Eşitlik 4 kullanılmıştır [39].

$$\text{Şişme derecesi (S)} = (m_{\text{ıslak jel}} - m_{\text{kuru jel}}) / m_{\text{kuru jel}}$$

3.7.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektrometresi ile Yapı Analizi

PHEMA temelli kriyojellerin yapısının jelatin, KOL Tip IV ve FN ile zenginleştirilmesinin başarısı FTIR-ATR (Thermo Fisher Scientific, Nicolet İ50, Waltham, MA, ABD) ile incelenmiştir. PHEMAGEL'in yapısına jelatinin, PHEMA+KOL Tip IV ve PHEMAGEL+FN kriyojellerin yapısına ise Kol tip IV ve FN'nin katılıp katılmadığının belirlenebilmesi için infrared spektrumları alınmıştır. Kriyojeller analiz öncesi oda sıcaklığında kurutuldu ve jellerin spektrumu 650-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında alındı. FTIR analizi için HÜNİTEK'ten hizmet alımı yapılmıştır.

3.7.3. Mikro Bilgisayarlı Tomografi (Mikro-CT)

Farklı özelliklerle sentezlenmiş olan kriyojellerin gözenek boyutlarını, dağılımlarını ve porlar arası bağlantıları inceleyebilmek amacıyla PHEMA, jelatin içeren PHEMAGEL, jellerin yapısına katılan KOL tip IV içeren PHEMA+KOL tip IV ve FN içeren PHEMAGEL+FN grupları için Mikro-CT taraması (16 MP Bruker Skyscan 1272, ABD) yapılmıştır. Kriyojeller analiz için silindirik olarak sentezlenmiştir ve analiz öncesi liyofilizatör (LyoQuest, Telstar) ile dondurularak kurutulmuştur. Mikro-CT taraması için jeller X-ışını kaynağı önünde 360° döndürüldü. Kriyojellerin 3 boyutlu morfolojik analizleri elde edildi. HÜNİTEK'ten hizmet alımı yapılarak mikro-CT analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.8. Folik Asit (FA) Miktarının ELISA ile Ölçülmesi

ELISA ile spektrofotometrik ölçüm yöntemi FA' nın *in vitro* salım davranışlarını belirleyebilmek için uygulanmıştır. Farklı özellikler ile sentezlenmiş olan PHEMA, PHEMA+KOL tip IV, PHEMAGEL ve PHEMAGEL+FN kriyojel gruplarına bağlanan FA molekülünün miktarını saptayabilmek amacıyla hazırlanan FA çözeltisinden kriyojellere bağlanmadan önce ve 24 saat'lik bağlanmadan sonra örnekler eppendorf tüplerine alınmıştır. FA salım analizi için alınan örnekler Human Folic Acid ELISA Kiti (Katalog No EA0051Hu, Bioassay Technology Laboratory, China) kullanılarak üreticinin talimatları izlenmiştir ve mikropalak okuyucuda (BIOTEK, µQuant) spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır.

Kriyojellere bağlanan FA bağlanma sonrası analizi için serumlu DMEM F-12 besiyerindeki salımlarına bakılmıştır.

Literatür araştırmaları sonucunda salım analizleri için 4, 10, 24 ve 48 saat belirlenmiştir. Sterilizasyonu sağlanan kriyojeller *in vitro* salım analizi için hazırlanmıştır. FA salım analizi için PHEMA+FA, PHEMA+KOL Tip IV+FA, PHEMAGEL+FA ve PHEMAGEL+FN+FA olmak üzere dört kriyojel grubuna bakılmıştır. Kriyojeller 24 gözlü steril plakalara yerleştirilmiştir. Plakaya yerleştirilen kriyojellerin üzerine 1 mL DMEM F-12 besi ortamı eklenmiştir. Daha sonra % 5 CO₂ nem koşullarında ve 37°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. Belirlenen sürelerde besi ortamından örnekler alınarak eppendorf tüplere aktarılmıştır ve alınan miktar kadar besi ortamı geri eklenmiştir. Plaka tekrar inkübasyona bırakılarak son salım süresine kadar alınan örnekler 4°C’de saklanmıştır. 48. saat örnekleri de alındıktan sonra bütün örnekler bir araya getirilmiştir ve çalışılmadan önce 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Toplanan örnekler üreticinin belirtmiş olduğu protokol izlenerek 450 nm’de (BIOTEK, µQuant) okunarak analiz edilmiştir.

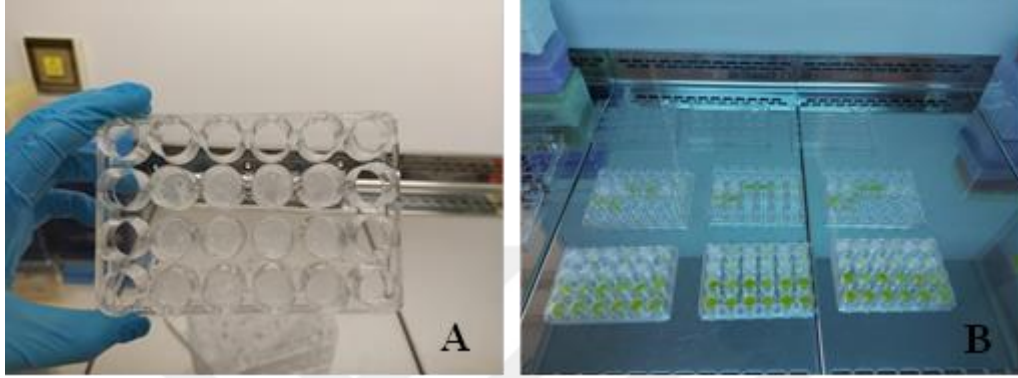
3.9. Kriyojeller ile *In vitro* Hücre Kültür Çalışmaları

Bu çalışma kullanılacak kriyojellerin kalınlığını ve boyutunu belirleyebilmek amacıyla 24 ve 48 gözlü hücre kültür plaklarına uygun iki farklı boyutta kriyojeller sentezlenmiştir. Kriyojellere BeWo, HUVEC ve 3:1 hücre oranı ile hücre ekimi gerçekleştirilmiştir ve sonrasında 24 göze uygun jel boyutu ile deneylere devam edilmiştir. Farklı özellikler ile hazırlanmış olan 8 kriyojelin biyouyumlu olup olmadığını inceleyebilmek ve hücrelerin kriyojellerdeki proliferasyon yeteneklerini anlayabilmek için jellere BeWo, HUVEC ve ortak kültürler (3 BeWo, 1 HUVEC oranı) ekilmiştir. Hücre canlılığını belirleyebilmek için 2, 4 ve 7.gün inkübasyonlarda MTT canlılık analiz testi uygulanmıştır.

3.9.1. Sterilizasyon

Kriyojeller hücre kültür çalışmalarında kullanılmadan önce sterilize edilmiştir. İlk olarak % 70’lik alkol (v/v) içerisinde 60 dakika boyunca üç kez çalkalayıcı üzerinde yıkanmıştır. Sonrasında ise aynı şekilde streil ultra saf su ile üç kez jellerin yıkanması sağlanmıştır. Hücrelerin kültür plak tabanına tutunmasını engelleyen parafilm, plakanın taban boyutunda kesilerek % 70’lik (v/v) alkol içerisinde 20 dakika bekletildi.

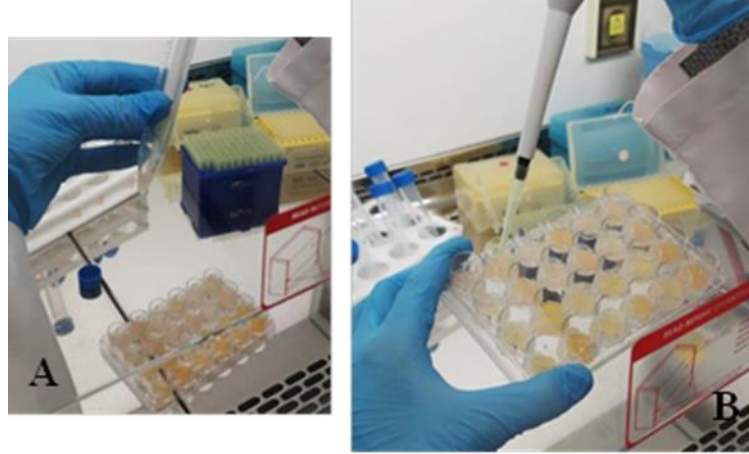
Parafilm'ler steril PBS'ten geçilerek kültür plaka tabanlarına yerleştirildi ve sterilizasyon için 45 dakika mor ötesi (UV) ışını altında bırakıldı. Kriyojeller ise parafilm kaplı plakalara yerleştirildi ve 45 dakika mor ötesi (UV) ışını altında bırakıldı. Bu şekilde kriyojellerin sterilizasyonu sağlanarak hücre kültür çalışmalarına uygun hale getirilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. A. Parafilm ile tabanı kaplanmış 24 gözlü hücre kültür plağı, B. Sterilizasyonu yapılan kriyojel gruplarının UV ışını altında bekletilmesi.

3.9.2. Kriyojel Doku İskelesindeki Hücrelerin MTT Canlılık Analizleri

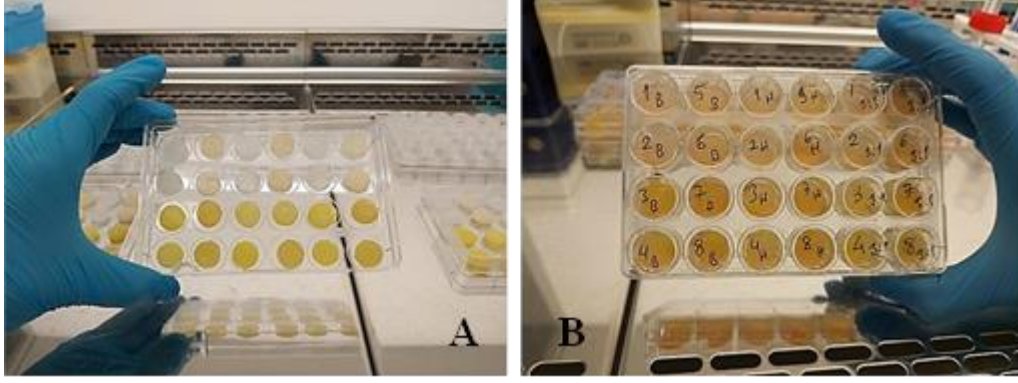
Farklı özellikler ile hazırlanan kriyojellerin doku iskelesi olarak kullanılabilirliği ikilenme süreleri farklı olan BeWo ve HUVEC hücrelerinin mono kültürü ve 3:1 (BeWo-HUVEC) hücre oranının ortak kültürü ile incelenmiştir (Şekil 3.4). Sterilizasyonu sağlanan kriyojellere hücre ekimi yapılmadan önce kriyojeller hücrelerin üreme koşullarına uygun besiyeri ile koşullandırılmıştır. Kriyojeller, % 10'luk FSS ve % 1'lik penisilin ve streptomisin içeren DMEM F-12 besi ortamı içerisinde 2 saat boyunca inkübe edilmiştir.



Şekil 3.4. Kriyojellere ekilecek hücrelerin santrifüj sonrası hücre peletleri, B. Hücre peletinin kriyojel gruplarına ekilmesi gösterilmiştir.

3.9.2.1. Kriyojel Doku İskelelerinde Mono ve Ortak Kültür Grupları

Farklı özellikler ile hazırlanmış olan kriyojel doku iskelelerinin sito-uyumluluğunu ve hücrelerin kriyojellerdeki proliferasyon yeteneklerini anlayabilmek için ikilenme zamanları farklı olan BeWo ve HUVEC hücrelerinin mono kültürü ve 3:1 (BeWo-HUVEC) hücre oranında ortak kültürü gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5). Farklı içeriklere sahip 8 kriyojel grubu 24 gözlü plaka boyutuna uygun olacak şekilde sentezlenmiştir. BeWo ve HUVEC hücreleri jellere tek aşamada, 3:1 hücre oran grubu ise iki aşamada ekilmiştir. Hücre ekilmesi yukarıda belirtildiği şekilde aynı işlemler uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Kriyojel başına BeWo hücreleri için 1×10^6 hücre/jel, HUVEC hücreleri için $2,5 \times 10^5$ hücre/jel ve ortak kültür 3:1 oranında ise totalde 1×10^6 hücre/jel gelecek şekilde Tripsin/EDTA ile 75 cm^2 'lik flask yüzeyinden kaldırılan hücreler 2, 4 ve 7 gün için üç tane santrifüj tüpüne aktarılmıştır ve 5 dakika 800 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen hücre peletleri kriyojel gruplarına ekildi (Şekil 3.5). Kriyojeller besi ortam içermeden 1 saat % 5 CO_2 nem koşullarında ve 37°C sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı. Daha sonra kriyojel gruplarının mono kültürlerine 1 mL % 10'luk FSS ve % 1'lik penisilin ve streptomisin içeren DMEM F-12 besi ortamı eklendi. 3:1 oran grubunu içeren kriyojel gruplarına ise HUVEC hücrelerinin ekimi aynı işlemler uygulanarak yapılmıştır. 3:1 ortak kültür kriyojel grupları besi ortamı içermeden 1 saat inkübe edildikten sonra jel başına 1 mL besiyeri eklenmiştir. Kriyojellerdeki besiyerinin % 50'si 2 günde bir değiştirilmiştir. Hücrelerin canlılıkları 2, 4, ve 7 gün boyunca MTT canlılık analizi ile değerlendirildi.



Şekil 3.5. A. Farklı özelliklerle sentezlenen 8 farklı kriyojelin sito-uyumluluk analizi için hücre kültür plaklarına yerleştirilmesi, B. Kriyojellere hücre ekimi öncesi besiyeri ile inkübasyonu gösterilmiştir.

3.9.2.2. Kriyojel Doku İskelesindeki Mono ve Ortak Kültür Gruplarına Vortioksetin Uygulaması

Tüm kriyojel gruplarına ekilen BeWo, HUVEC ve 3:1 hücre oranının MTT canlılık analizlerinden sonra Vortioksetin uygulamasının yapılacağı kriyojel grupları belirlenmiştir. PHEMA, PHEMA+KOL Tip IV+FA, PHEMAGEL, PHEMAGEL+FN+FA kriyojel doku iskelelerine BeWo, HUVEC ve 3:1 hücre oranı ekilerek Vortioksetin doz uygulaması yapılmıştır. Çizelge 3.2’de deney grupları verilmiştir. Kriyojellere hücre ekimi yukarıda belirtildiği şekilde aynı işlemler uygulanarak yapılmıştır. Hücre ekimi gerçekleşen kriyojel grupları % 5 CO₂ nem koşullarında ve 37°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. Vortioksetin doz uygulaması HUVEC hücreleri için hücre ekiminden 24 saat sonra, BeWo ve 3:1 hücre oran grupları için ise 48 saat sonra gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası kriyojellerdeki besiyeri aspire edilerek ortamdan uzaklaştırılmıştır ve jel başına 1 mL PBS eklenerek jeller yıkanmıştır. Doz uygulaması için serumsuz DMEM F-12 besiyerinde hazırlanan 30 µM ve 60 µM Vortioksetin çözeltileri kriyojel başına 1 mL gelecek şekilde uygulanmıştır. Kontrol grubuna ise jel başına 1 mL serumsuz DMEM F-12 besiyeri eklenmiştir. Kriyojeller 37°C ve % 5 CO₂ içeren nem koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. Doz uygulamasının 2, 4 ve 7 gün boyunca MTT canlılık analizleri değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.2. Vortiooksetin uygulaması için belirlenen kriyojel grupları.

Mono ve Ortak Kültür	PHEMA	PHEMA + KOL TİP IV + FA	PHEMAGEL	PHEMAGEL + FN+FA	Vortiooksetin
BeWo	+	+	+	+	+
HUVEC	+	+	+	+	+
BeWo + HUVEC	+	+	+	+	+

3.9.2.3. MTT Canlılık Analizi

MTT (Sigma, Amerika) canlılık analizi kriyojellere ekilen hücrelerin canlılık oranlarının belirlenmesi için kullanılmıştır. Kriyojellerdeki hücrelerin canlılık analizleri için 2, 4 ve 7 gün inkübasyon süreleri literatüre göre belirlenmiştir. Her inkübasyon için aynı işlemler uygulanmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda biyoyuumluluk analizleri için kriyojellerdeki DMEM F-12 besiyeri ve doz uygulanan kriyojel gruplarındaki Vortiooksetin çözeltisi ortamdan aspire edilerek uzaklaştırılmıştır ve jel başına 1 mL PBS ile kriyojel grupları yıkanmıştır.

24 gözlü hücre kültür plaklarındaki kriyojeller için jel başına 1 mL serumsuz DMEM F-12 besiyeri ve üzerine 100 µL MTT solüsyonu eklenerek karanlıkta 3 saat 37°C ve % 5 CO₂ içeren nem koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında oluşan formazan kristallerini çözebilmek için hazırlanan DMSO/Amonyak (% 95 DMSO, % 5 Amonyak) çözeltisi jel başına 600 µL gelecek şekilde jellere eklenmiştir ve 15 dakika shakerda çalkalanmıştır. Mor renge dönüşen çözeltiden 100 µl çekilerek tekrarlı bir şekilde 96 gözlü plakaya aktarılmıştır ve 550 nm’de mikropak okuyucuda (BIOTEK, µQuant) spektrofotometrik ölçümü yapılmıştır. Açığa çıkan OD (optik dansite) değerleri ile kriyojellere ekilen hücrelerin % canlılığı hesaplanmıştır.

3.10. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi

3:1 hücre oranının çeşitli içeriklerle hazırlanmış olan farklı özelliklerdeki kriyojel gruplarına yapılan canlılık analizleri sonucunda en iyi yüzde hücre canlılık sonuçlarını veren kriyojel gruplarına (PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV) SEM görüntülemesi yapılmıştır. PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojeller ile etkileşimlerini, hücrelerin kriyojel yüzeyine tutunup tutunmadığını ve hücrelerin farklı jellerdeki proliferasyon yeteneklerini anlayabilmek amacıyla hücre ekiminden 7 gün sonra SEM (ZEISS, EVO 50) analizi ile kriyojellerin doku iskelesi olarak kullanılabilirliği incelenmiştir.

Kriyojellerin gözeneklerini ve yüzey yapılarını inceleyebilmek için hücre ekimi yapılmamış boş PHEMA ve kriyojellere KOL tip IV bağlanmasının gözenek boyutları, gözenek duvarları, yüzey ve yığın yapıları üzerine olan etkisini incelemek ve karşılaştırmak amacıyla PHEMA+KOL tip IV kriyojelin de SEM görüntüleri alınmıştır. Hücreleri kriyojel gruplarının SEM görüntüleri Jeoloji Mühendisliği Bölümünde bulunan Elektron Mikroskopi Laboratuvarında yapılmıştır.

- Hücre içeren kriyojel gruplarının SEM analizi için 3:1 hücre oranı için totalde 1×10^6 hücre/jel (BeWo 75×10^4 hücre/jel, HUVEC 25×10^4 hücre/jel) olacak şekilde kriyojellere hücre ekimi yukarıda belirtilen işlemler uygulanarak gerçekleştirilmiştir. 7 gün boyunca inkübasyona bırakılan kriyojellerin 2 günde bir besiyerin % 50'si değiştirilmiştir.
- İnkübasyon sonrası fiksasyon işlemi için öncelikle besiyeri kriyojellerden aspire edilerek uzaklaştırılmıştır ve jeller PBS ile yıkanmıştır.
- Kriyojel başına 1 mL % 2,5'lük (v/v) hazırlanan gluteraldehit fiksatif jellerin üzerine eklendi ve jelleri +4°C'de karanlıkta 30 dakika boyunca fiksasyona bırakıldı. Fiksatif kriyojellerden aspire edilerek uzaklaştırıldı ve jeller PBS ile yıkandı.
- Dehidrasyon işlemi için kriyojeller sırası ile % 30, % 50, % 70 ve % 100 alkol serilerinde 5 dakika bekletilmiştir. Kriyojel başına 600 µl heksametildisilazan (HMDS) solüsyonu eklenerek 10 dakika bekletilmiştir. Sonrasında ise jeller HMDS içerisinde çıkartılarak oda sıcaklığında kurutulup altın-paladyum EMS550X cihaz modeli ile kaplanmıştır ve SEM görüntüleri alınmıştır.
- Hücre içermeyen kriyojel gruplarının SEM analizi için, kriyojeller 40°C sıcaklıktaki etüv içerisinde kurutulmuştur ve altın-paladyum ile kaplanarak SEM görüntüleri alınmıştır. Hücresiz kriyojellerin SEM (JEOL, JEM 1200 EX, Tokyo, Japonya) görüntüleri için HÜNİTEK'ten hizmet alımı yapılmıştır.

3.11. β -hCG Hormon Seviyesinin ELISA ile Belirlenmesi

β -hCG hormon miktarının ELISA ile ölçülmesi için PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel gruplarına BeWo ve 3:1 oran grubunun hücre ekimi yapılmıştır. BeWo hücreleri için kriyojel başına 1×10^6 jel/hücre, 3:1 oranda ise totalde 1×10^6 jel/hücre olacak şekilde BeWo için 75×10^4 jel/hücre, HUVEC için ise 25×10^4 jel/hücre pelet halinde jellere ekilmiştir. BeWo ve 3:1 oranı 2 gün 37°C 'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası jeller PBS ile yıkanmıştır ve sonrasında $30 \mu\text{M}$ ve $60 \mu\text{M}$ Vortiksetin uygulaması yapılmıştır.

Kriyojel gruplarından kontrol, $30 \mu\text{M}$ ve $60 \mu\text{M}$ Vortiksetin ile 2, 4 ve 7 günlük inkübasyon sonunda kültür ortamları alınmıştır. Alınan süpernatantlar -20°C 'de saklanmıştır.

β -hCG hormon kiti için üreticinin talimatları izlenerek standart eğri grafiği oluşturulmuştur. Süpernatantlardaki hormon miktarının ölçümü için aşağıda yer alan üreticinin belirtmiş olduğu protokol uygulanmıştır.

- Süpernatantlar ve kit solüsyonları kullanılmadan 30 dakika önce oda sıcaklığına çıkartılmıştır.
- Örnekler 4°C $1000 \times g$ 'de 20 dakika santrifüj edilmiştir (Hettich, Mikro 22R, Zentrifüjgen, Almanya).
- $100 \mu\text{L}$ örnek kit içerisindeki antijen kaplı 96 kuyucuklu ELISA plakalarına eklenmiştir ve 37°C 'de 90 dakika inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonunda kuyulardaki sıvı aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Yıkama yapılmadan kuyulara $100 \mu\text{L}$ biyotinlenmiş tespit çalışma solüsyonu eklenmiştir ve 37°C 'de 60 dakika inkübe edilmiştir.
- Kuyular boşaltılmıştır ve her kuyu $350 \mu\text{L}$ yıkama solüsyonu ile 3 kere yıkanmıştır.
- Her kuyuya $100 \mu\text{L}$ konsantre horse radish peroksidaz (HRP) konjugat çalışma solüsyonu eklenmiştir ve 37°C 'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyular boşaltılmıştır ve her kuyu $350 \mu\text{L}$ yıkama solüsyonu ile 5 kere yıkanmıştır.

- Kuyulara 90 µL substrat solüsyonu karanlıkta eklenerek 37°C’de 15 dakika inkübasyon bırakılmıştır. Sonrasında ise her kuyuya reaksiyonu durdurmak için 50 µL durdurma solüsyonu eklenmiştir.
- Örneklerin OD okuması 450 nm’de ELISA cihazında yapılmıştır.

Standart eğri grafiğindeki absorbans-konsantrasyon (OD) değerleri için 4-parametrelili lojistik eğri grafiği seçilmiştir.

3.12. MMP-2 ve MMP-9 Protein Seviyelerinin ELISA ile Belirlenmesi

MMP-2 ve MMP-9 protein miktarının ELISA ile ölçülmesi için PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel gruplarına BeWo ve 3:1 oranında hücre ekimi yapılmıştır. BeWo hücreleri için 1×10^6 jel/hücre, 3:1 oranında ise 1×10^6 jel/hücre olacak şekilde BeWo için 75×10^4 jel/hücre, HUVEC için ise 25×10^4 jel/hücre pelet halinde jellere ekilmiştir. BeWo ve 3:1 oranı DMEM-F12 besiyerinde 2 gün 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası jeller PBS ile yıkanmıştır ve sonrasında 30 µM ve 60 µM Vortiksetin uygulaması yapılmıştır.

Kriyojel gruplarından kontrol, 30 µM ve 60 µM Vortiksetin dozlarının 2, 4 ve 7 günlük inkübasyonları sonunda kültür ortamları alınmıştır. Alınan süpernatantlar -20°C’de saklanmıştır.

MMP-2 ve MMP-9 protein kitleri için üreticinin talimatları izlenerek standart eğri grafiği oluşturulmuştur. Süpernatantlardaki protein miktarının ölçümü için aşağıda yer alan üreticinin belirtmiş olduğu protokol uygulanmıştır.

- Süpernatantlar ve kit solüsyonları kullanılmadan 30 dakika önce oda sıcaklığına çıkartılmıştır.
- Örnekler 4°C 1000 x g’de 20 dakika santrifüj edilmiştir (Hettich, Mikro 22R, Zentrifijgen, Almanya).
- 100 µL örnek kit içerisindeki antijen kaplı 96 kuyucuklu ELISA plakalarına eklenmiştir ve 37°C’de 90 dakika inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonunda kuyulardaki sıvı aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Yıkama yapılmadan kuyulara 100 µL biyotinlenmiş tespit çalışma solüsyonu eklenmiştir ve 37°C’de 60 dakika inkübe edilmiştir.

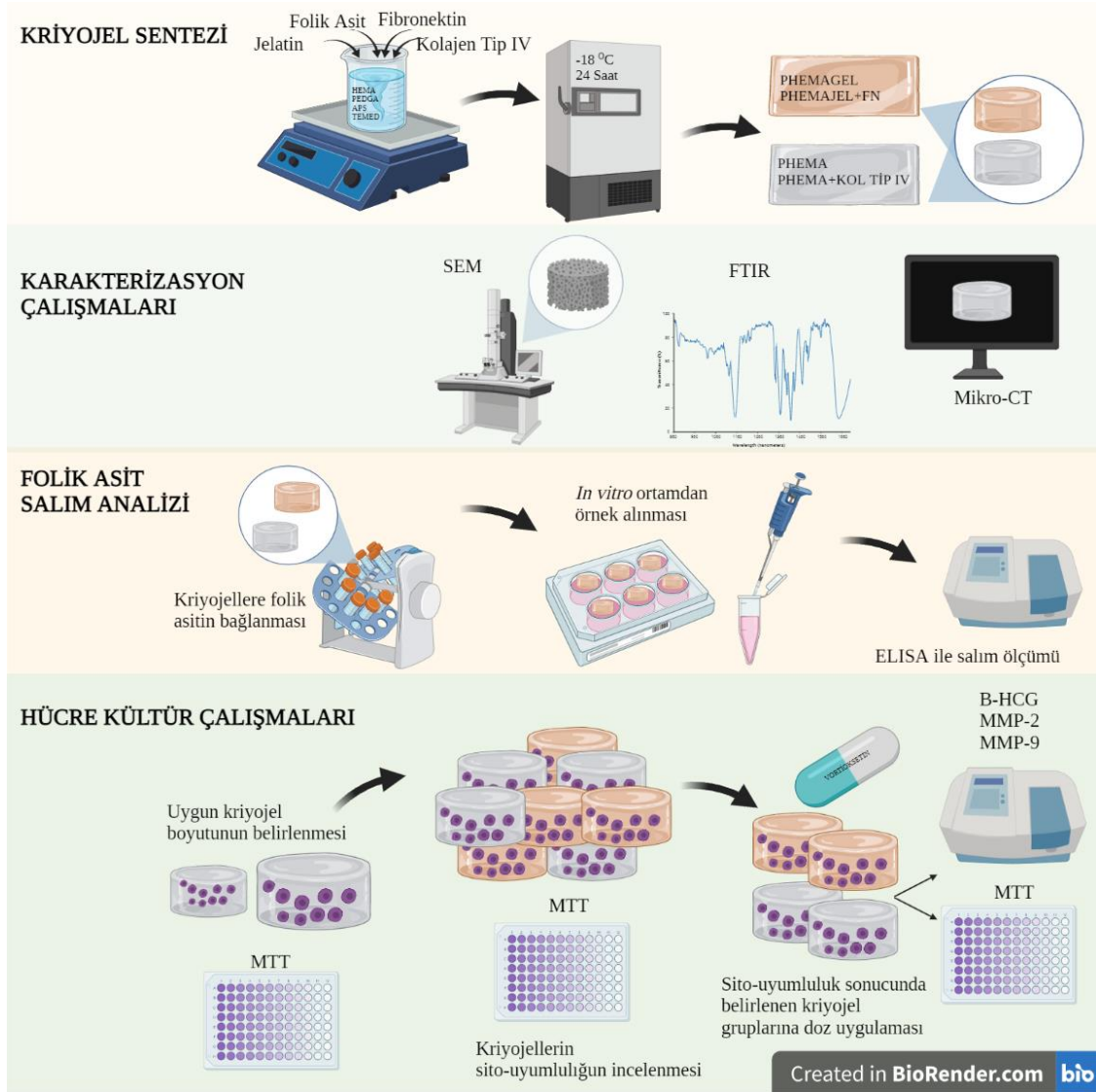
- Kuyular boşaltılmıştır ve her kuyu 350 µL yıkama solüsyonu ile 3 kere yıkanmıştır.
- Her kuyuya 100 µL konsantre HRP konjugat çalışma solüsyonu eklenmiştir ve 37°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyular boşaltılmıştır ve her kuyu 350 µL yıkama solüsyonu ile 5 kere yıkanmıştır.
- Kuyulara 90 µL substrat solüsyonu karanlıkta eklenerek 37°C’de 15 dakika inkübasyon bırakılmıştır. Sonrasında ise her kuyuya reaksiyonu durdurmak için 50 µL durdurma solüsyonu eklenmiştir.
- Örneklerin OD okuması 450 nm’de ELISA cihazında yapılmıştır.

Standart eğri grafiğindeki absorbans konsantrasyon (OD) değerleri için 4-parametrelili lojistik eğri grafiği seçilmiştir.

Şekil 3.6’da deneylerin akış şeması verilmiştir.

3.13. İstatistiksel Analizler

Çalışma kapsamında elde edilen verilerin istatistiği IBM SPSS Statistics 23 programında incelenmiştir. Analizler yapılmadan önce verilerin homojen olup olmadığı Levene analizi ile değerlendirilmiştir. Kriyojellerin boyutunun belirlenmesi için T-testi (birbirinden bağımsız iki örneklem testi) kullanılmıştır. Kriyojellere bağlanan folik asitin salım analizi, kriyojel gruplarına uygulanan MTT hücre canlılık analizi, Vortiksetin doz uygulaması, β -hCG hormon analizi, MMP-2 ve MMP-9 protein analizleri verilerin homojen olduğu durumda ANOVA, verilerin homojen olmadığı durumlarda ise Welch testi ile incelenmiştir. Gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde post hoc test olarak ANOVA için Tukey, Welch için ise Games Howells analizleri yapılmıştır. Tüm analizler için önemlilik düzeyi $p \leq 0,05$ kabul edilmiştir.

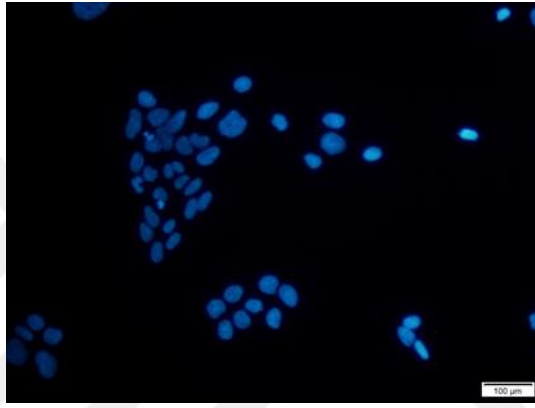


Şekil 3.6. Deneysel akış şeması.

4. SONUÇLAR

4.1. Sterilite Testleri

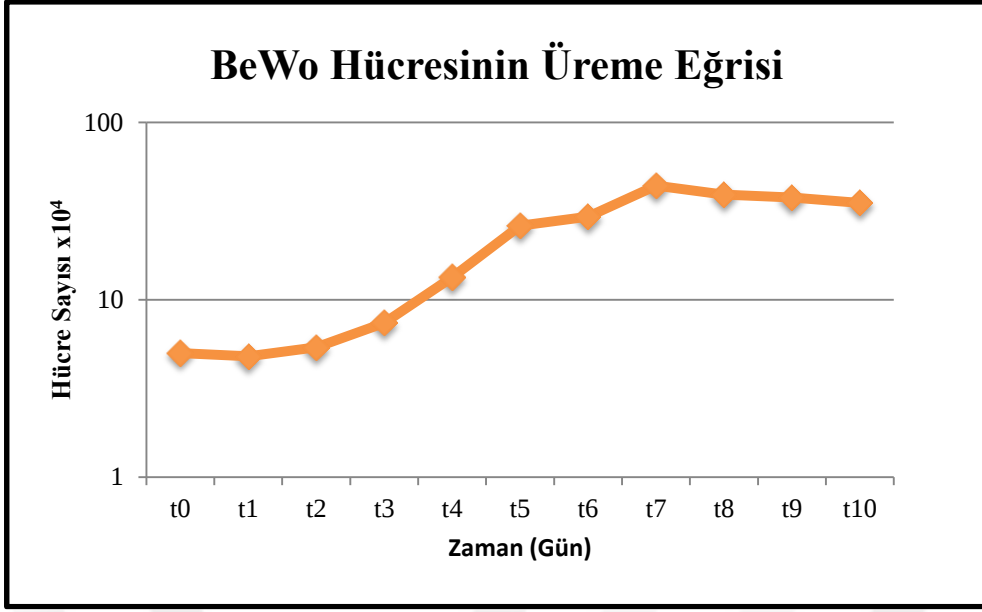
BeWo hücrelerinde çekirdek DAPI ile boyanarak mikoplazma varlığı test edilmiştir. Boyama sonucu çekirdeklerde ışıma görülmemiştir (Şekil 4.1.). HUVEC hücrelerinin mikoplazma varlığı hizmet alımı yapılarak ELISA kiti ile incelemiştir. Yapılan test sonucuna göre mikoplazma sonucu negatif çıkmıştır. Sterilite testleri sonucunda hücrelerin sağlıklı olduğu görülmüştür ve deneylere devam edilmiştir.



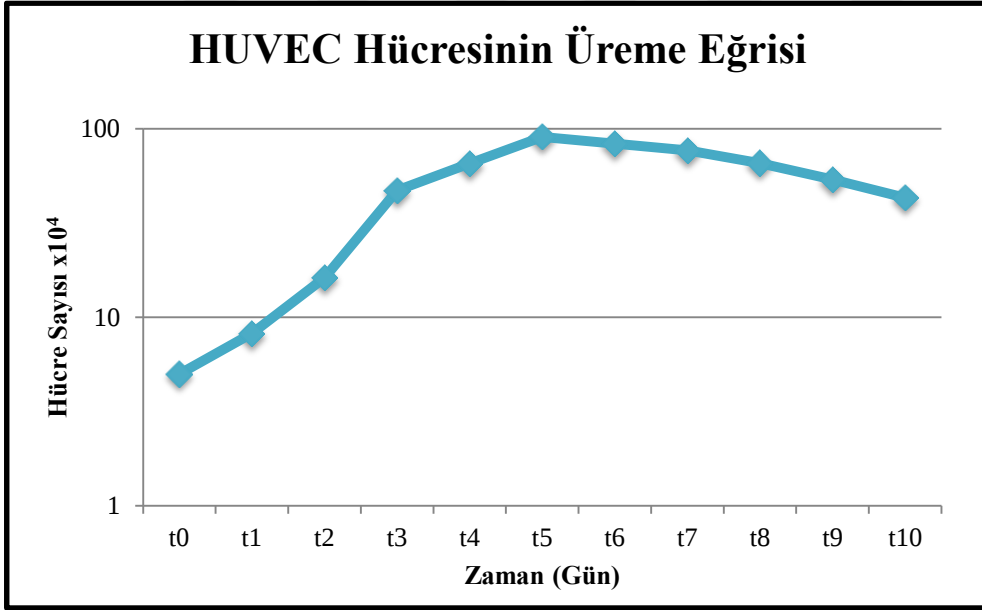
Şekil 4.1. BeWo hücrelerinin DAPI ile boyanmış çekirdeklerinin floresan mikroskop görüntüsü.

4.2. Üreme Eğrisi

Bewo ve HUVEC hücrelerinin üreme karakterinin anlaşılması için yapılan 10 günlük hücre sayım sonuçlarının grafikleri aşağıda verilmiştir. Sayım sonuçlarına göre hücrelerin ikilenme zamanları hesaplanmıştır. İkilenme zamanlarının belirlenebilmesi için logaritmik grafik verileri kullanılmıştır. BeWo hücrelerinin hücre sayısındaki artışı t3'ten başlayarak t7'ye kadar devam etmiştir. BeWo hücrelerinin üreme eğrisi Şekil 4.2'de verilmiştir ve ikilenme süresi PDT=53 saat olarak belirlenmiştir. HUVEC hücrelerinin hücre sayısındaki artışı en yüksek t5'te görülmüştür. HUVEC hücrelerinin üreme eğrisi Şekil 4.3'te verilmiştir ve ikilenme süresi PDT=28 saat bulunmuştur.



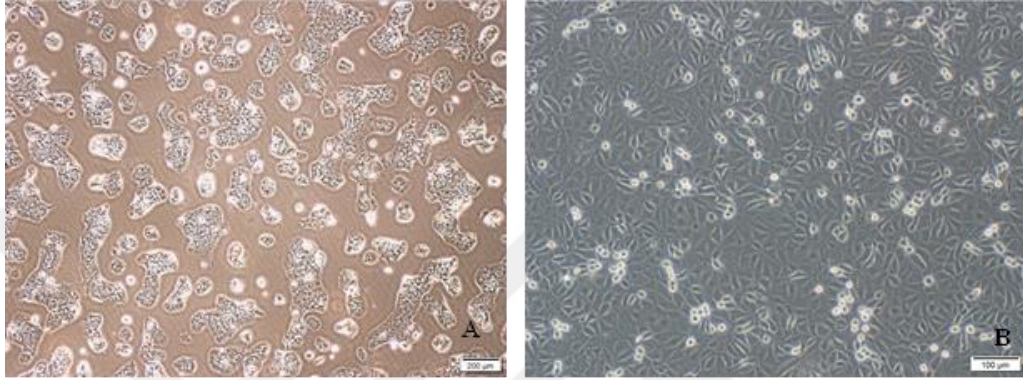
Şekil 4.2. BeWo hücresinin üreme eğrisi grafiği.



Şekil 4.3. HUVEC hücresinin üreme eğrisi grafiği.

4.3. Hücrelerin Morfolojik Görüntüleri

BeWo ve HUVEC hücrelerinin ışık mikroskobu altında morfolojileri incelenmiştir (Şekil 4.4.). BeWo hücreleri epitelyal tipte olup ve yüzeyde kümeli olarak çoğalırken, HUVEC hücreleri endotelyal tipte hücrelerdir ve tek tabakalı bir şekilde çoğalmaktadırlar. Her iki hücre tipi yüzeye bağlı adherent olarak üremektedirler.



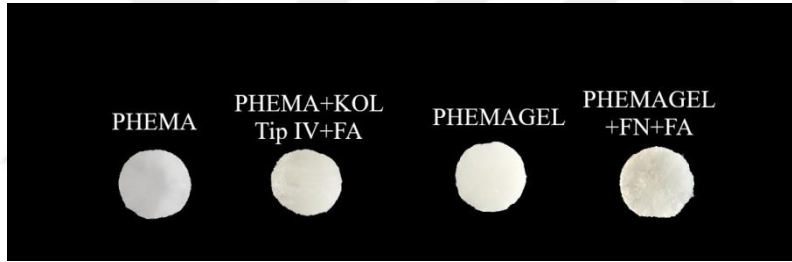
Şekil 4.4. BeWo ve HUVEC hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri. A. BeWo hücresi (200 µm ölçek), B. HUVEC hücresi (100 µm ölçek).

4.4. PHEMA Temelli Jelatin ve Protein İçeren Süpermakrogözenekli Kriyojellerin Karakterizasyon Sonuçları

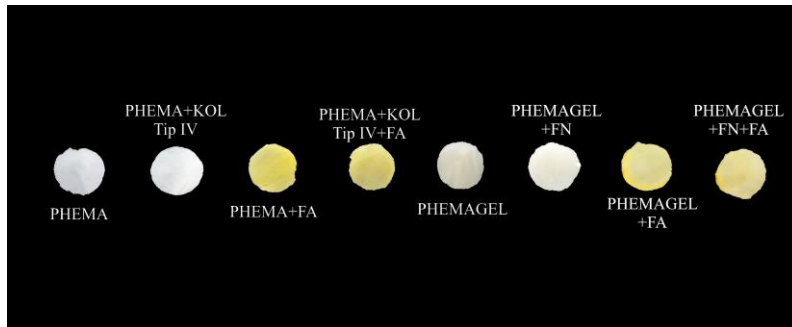
Tez kapsamındaki PHEMA temelli kriyojellerin polimerizasyonu 24 saat boyunca -18°C’de gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon sonrasında oda sıcaklığına çıkartılan kriyojellerin yapısındaki buz kristallerinin erimesi sağlanmıştır. Polimerizasyon sırasında oluşan buz kristallerinin erimesiyle birbirleriyle bağlantılı makrogözenekler oluşmuştur.

PHEMA temelli kriyojelin yapısına jelatin, KOL Tip IV ve FN ile fonksiyon kazandırılarak dört farklı özelliğe sahip kriyojellerin sentezlenmesi sağlanmıştır. PHEMA kriyojellerin yapısına jelatin ve hücre dışı elemanların katılmasıyla kriyojellerde meydana gelen değişimler incelenmiştir. Hazırlanan PHEMA, PHEMA+KOL Tip IV, PHEMAGEL, PHEMAGEL+FN kriyojellerin sağlam, esnek ve süngerimsi yapıda oldukları morfolojik olarak gözlenmiştir.

Sentezlenen dört farklı özellikteki kriyojeller Şekil 4.5'te verilmiştir. PHEMAGEL ve PHEMAGEL+FN; PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV kriyojele oranla içeriğinde bulunan jelatinden dolayı yapı olarak daha sıkidır. Kolajen ve fibronektinin PHEMA+KOL Tip IV ve PHEMAGEL+FN kriyojellerin yapısına katılması kriyojellerin fiziksel yapısının daha esnek ve daha sağlam olmasını sağlamıştır. Jelatin içeren PHEMAGEL ve PHEMAGEL+FN kriyojellerin jelatin içermeyen PHEMA kriyojel gruplarına göre renklerinin daha koyu olduğu gözlenmiştir. Farklı özellikler ile hazırlanmış olan kriyojellere 24 saat boyunca çalkalayıcı içerisinde folik asitin adsorpsiyonu sağlanmıştır. Adsorpsiyon sonrası oluşan PHEMA+FA, PHEMA+KOL Tip IV+FA, PHEMAGEL+FA, PHEMAGEL+FN+FA kriyojellerin morfolojik incelemesinde jelatin bağlı olan grupların daha sıkı ve sağlam olduğu gözlenmiştir. Şekil 4.6'da folik asit bağlanması ile oluşan tüm kriyojel grupları verilmiştir. Folik asit ile fonksiyon kazandırılan kriyojel gruplarının sarı renkte olduğu görülmüştür.



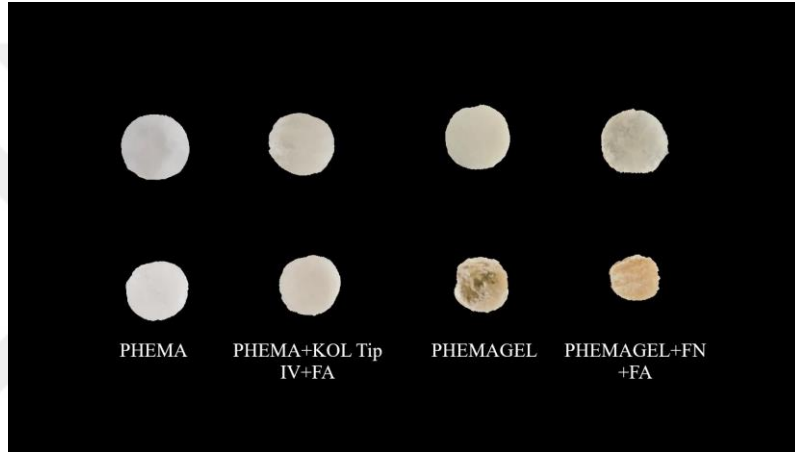
Şekil 4.5. PHEMA temelli sentezlenen kriyojel gruplarının kesilmiş disk görüntüleri.



Şekil 4.6. PHEMA temelli sentezlenen kriyojellere folik asit bağlanmasıyla oluşan sekiz farklı kriyojel grubunun kesilmiş disk görüntüleri (folik asit bağlı kriyojeller sarı renkte).

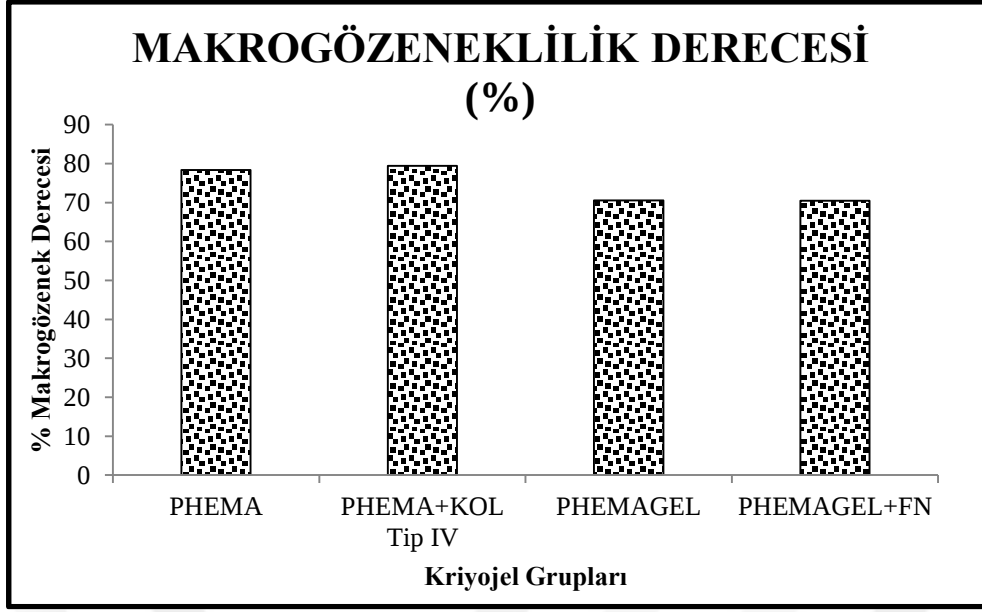
4.4.1. Kriyojellerin Şişme Özellikleri

Tez çalışması kapsamında sentezlenen PHEMA temelli kriyojellerin yukarıda belirtilen özelliklerinden dolayı şişme özelliklerinin değerlendirilmesi önem kazanmıştır. Aşağıdaki grafiklerde PHEMA, PHEMA+KOL Tip IV, PHEMAGEL, PHEMAGEL+FN kriyojellerin şişme deneyleri sonucu verilmiştir. Şekil 4.7’de kriyojellerin ıslak ve kuru görüntüleri verilmiştir. Kriyojellerin şişmiş ve kurutulmuş halleri arasında farklılık bulunmaktadır. Jelatin içeren kurutulmuş kriyojel gruplarının daha fazla büzüştüğü gözlenmiştir.



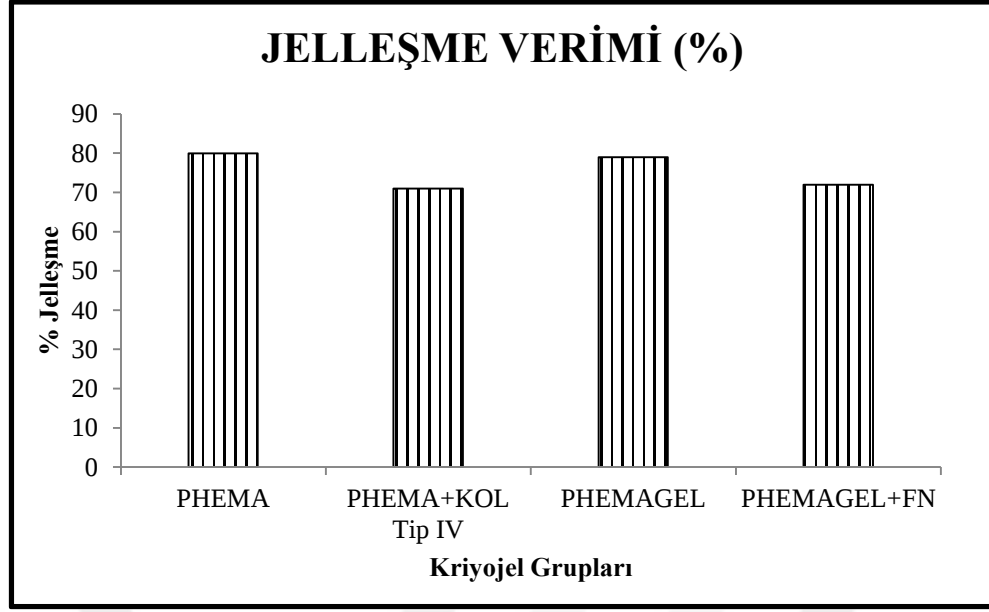
Şekil 4.7. PHEMA temelli sentezlenen kriyojellerin şişmiş (üst sırada) ve kuru (alt sırada) görüntüleri.

Makrogözeneklilik derecesi, kriyojellerin sahip olduğu geniş gözenekler hakkında bilgi vermektedir. Gözeneklerin boyut ve bağlantıları atık maddelerin atılması, gazların ve besinlerin daha rahat taşınabilmesi açısından önemlidir. Gözenek boyutu hücrelerin kriyojel doku iskelesine tutunabilmesini ve çoğalabilmesini etkilemektedir. Şekil 4.8’deki makrogözeneklilik sonucuna bakarak jelatin içeren PHEMAGEL ve PHEMAGEL+FN kriyojellere göre PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV kriyojellerin makrogözenek derecesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Jelatin içeren kriyojel gruplarının makrogözeneklilik derecesinde düşüş gözlenmiştir. Jelatinin yapıya katılması için çapraz bağlayıcı olarak kullanılan gluteraldehit monomer çözeltisinde yer alan serbest amin gruplarına bağlanmaktadır. Monomer olan HEMA’nın serbest amin gruplarına bağlanmasından dolayı makrogözeneklilik derecesinde azalma görülmüştür.



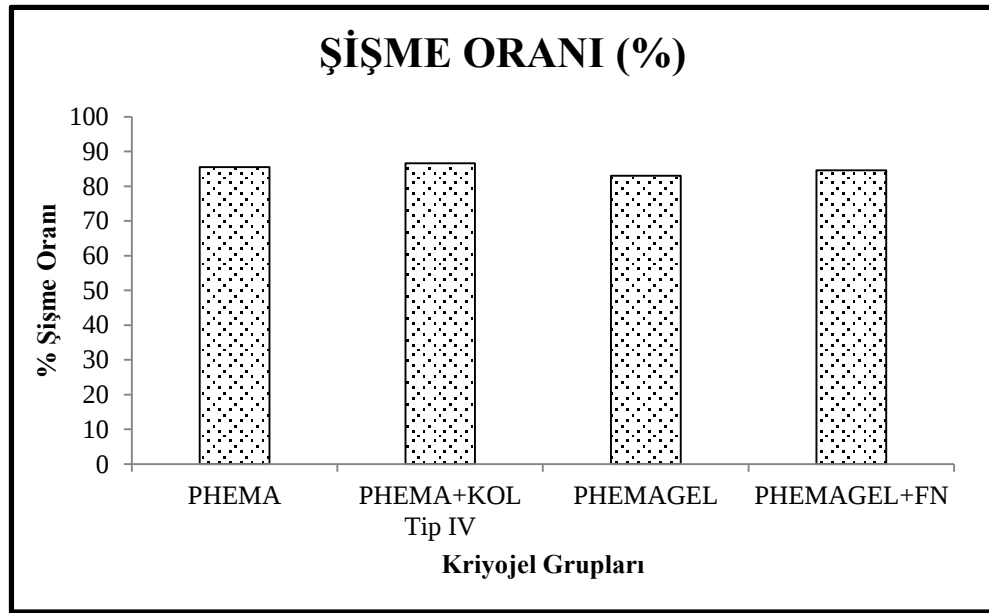
Şekil 4.8. PHEMA temelli kriyojellerin makrogözeneklilik dereceleri.

Jelleşme verimi sentezlenen kriyojellerin çapraz bağlanma etkinliği hakkında bilgi vermektedir. Jellerin sentezinde kullanılan monomerlerin polimerlere dönüşümünü göstermektedir. Tez kapsamında sentezlenen PHEMA kriyojelde çapraz bağlayıcı olarak PEGDA ve PHEMAGEL, PHEMA+KOL Tip IV, PHEMAGEL+FN kriyojellerde çapraz bağlayıcı olarak PEGDA ve gluteraldehit kullanılmıştır. Kriyojellerin jelleşme verimleri Şekil 4.9’da verilmiştir. PHEMA ve PHEMAGEL kriyojellerin, PHEMA+KOL Tip IV ve PHEMAGEL+FN kriyojellere göre jelleşme verimlerinin biraz daha yüksek olduğu görülmüştür. Hazırlanan kriyojellerin jelleşme verimleri % 70-80 arasında olup etkin bir şekilde jelleştikleri görülmüştür.



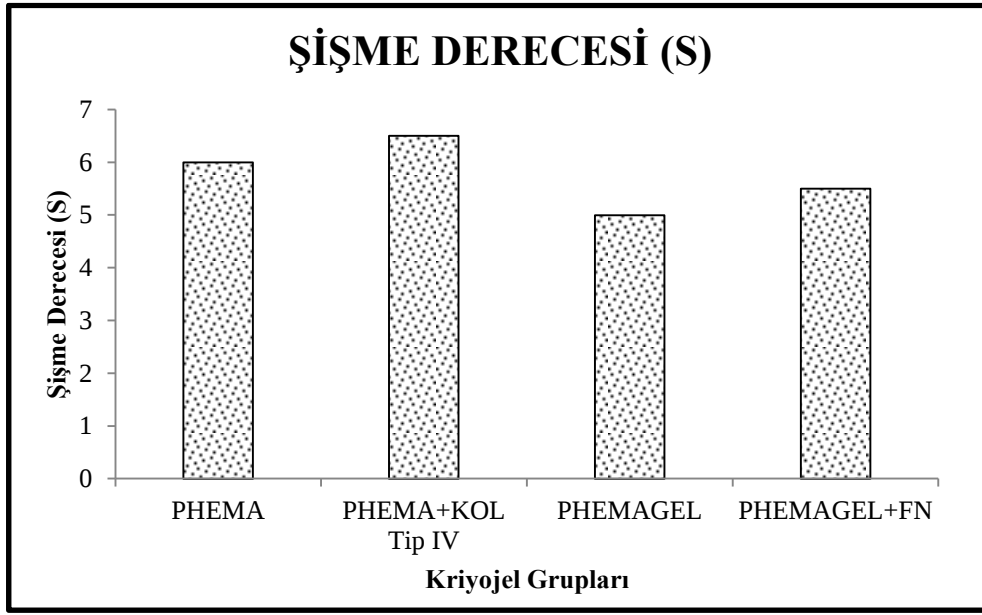
Şekil 4.9. PHEMA temelli kriyojellerin jelleşme verimleri.

PHEMA, PHEMA+KOL Tip IV, PHEMAGEL ve PHEMAGEL+FN kriyojellerin şişme oranları Şekil 4.10'da verilmiştir. Hazırlanan kriyojellerin şişme oranları incelendiğinde hazırlanan tüm kriyojellerin yüksek şişme oranlarına ve yüksek su tutabilme kapasitelerine sahip oldukları görülmüştür. Şişme oranlarının % 83-86 arasında olması ile hazırlanan kriyojellerin benzer şişme davranışı gösterdiği anlaşılmıştır.



Şekil 4.10. PHEMA temelli kriyojellerin şişme oranları.

Şekil 4.11’de verilen şişme dereceleri incelendiğinde jelatin içeren PHEMAGEL ve PHEMAGEL+FN kriyojellerin şişme derecelerinde PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV kriyojellere oranla biraz düşüş olduğu görülmüştür. Jelatinin yapıda bulunması PHEMAGEL ve PHEMAGEL+FN kriyojellerde PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV kriyojellere oranla daha az süngerimsi bir yapı oluşturmuş ve şişme derecesini bir miktar azaltmıştır.

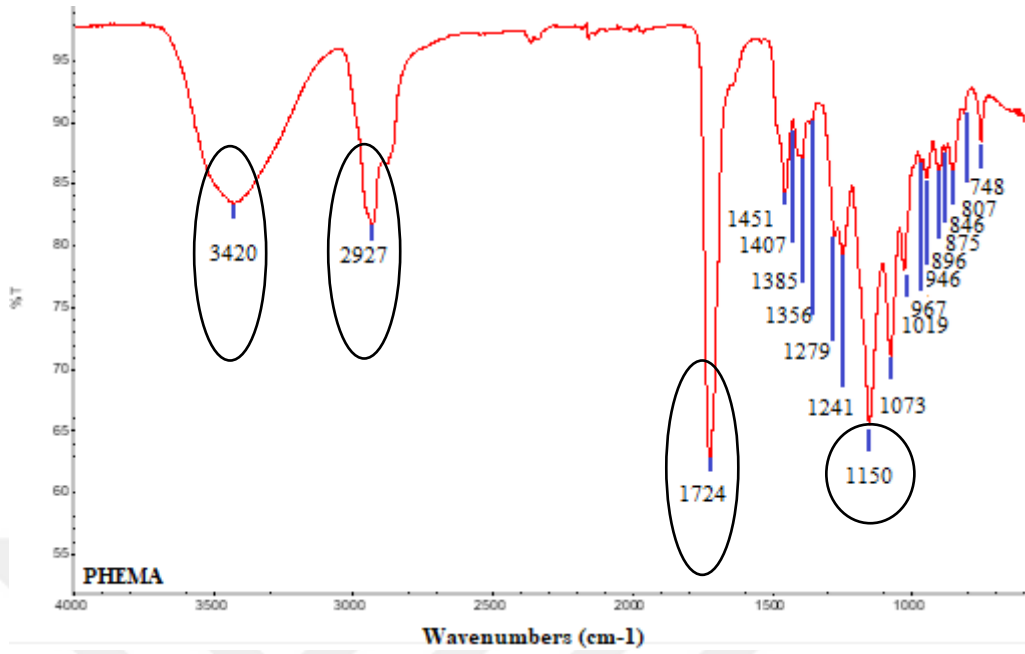


Şekil 4.11. PHEMA temelli kriyojellerin şişme dereceleri.

4.4.2. FTIR Analizi

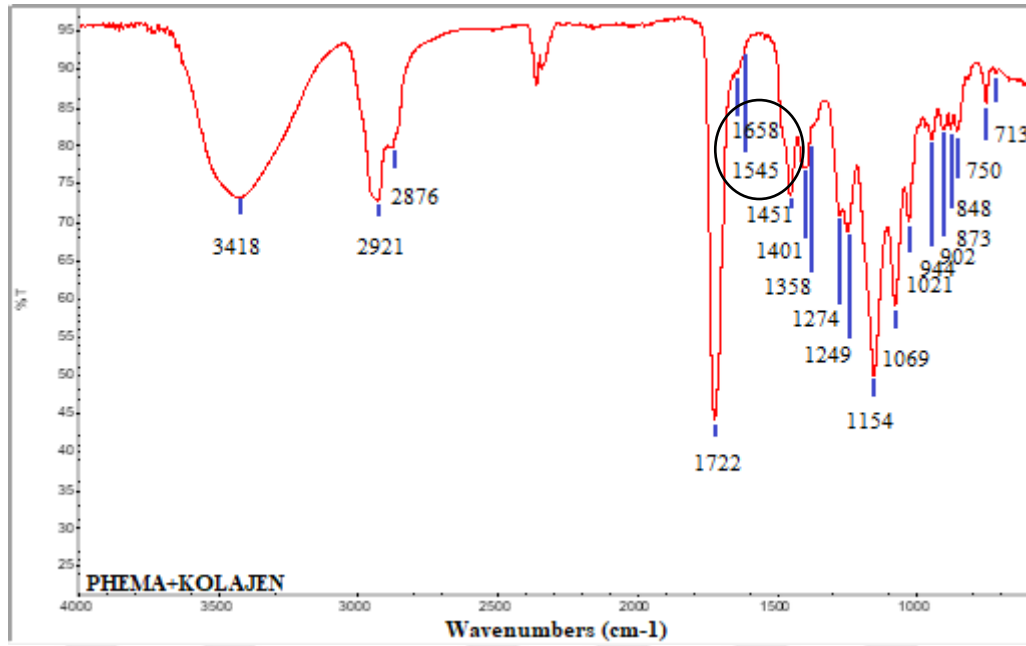
PHEMA temelli hazırlanan kriyojellere fonksiyon kazandırılması için jelatin, Kol Tip IV ve FN jellerin yapısına eklenmiştir ve PHEMAGEL, PHEMA+KOL Tip IV ve PHEMAGEL+FN kriyojeller sentezlenmiştir. Kriyojellerin yapısına jelatin, Kol Tip IV ve FN’nin katılıp katılmadığını gösterebilmek için jellerin infrared spektrumları alınmıştır. Spektrumlara düzgünleştirme ve otomatik zemin düzeltme işlemleri uygulanmıştır.

PHEMA kriyojelin infrared spektrumu Şekil 4.12’de verilmiştir. PHEMA kriyojelin spektrumları incelendiğinde 3420 cm⁻¹’da (O-H gerilme bandı), 2927 cm⁻¹’da (C-H gerilme bandı), 1724 cm⁻¹’de (C=O bandı) ve 1150 cm⁻¹’da (C-O gerilme bandı) görülmüştür. Bu bantlar monomer olan HEMA için karakteristik bantlardır [117].



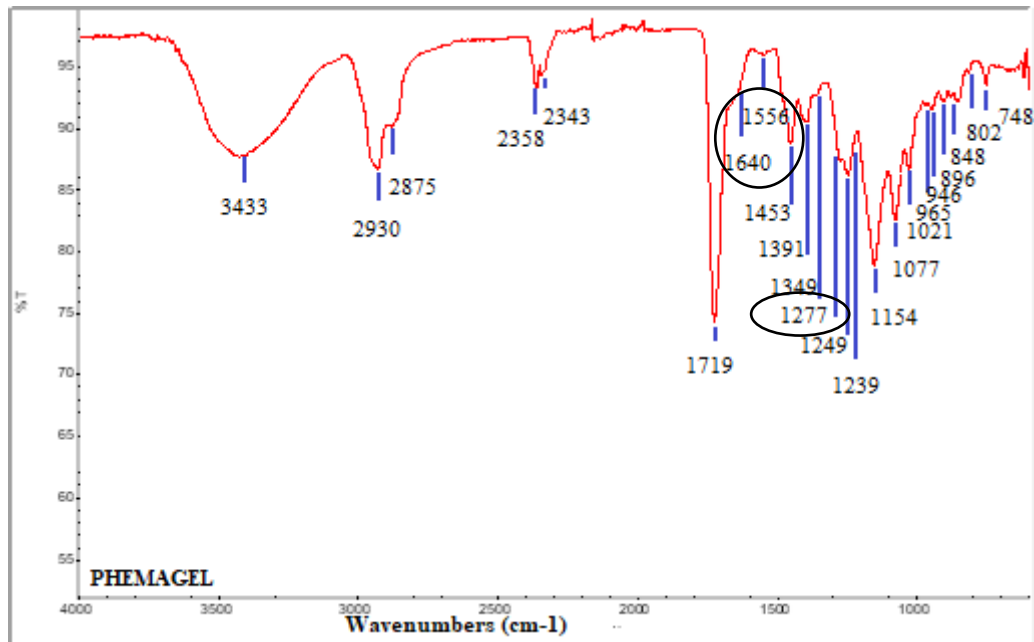
Şekil 4.12. PHEMA kriyojelin FTIR/ATR spektrumu.

PHEMA+KOL Tip IV kriyojelin infrared spektrumu Şekil 4.13'te verilmiştir. PHEMA+KOL Tip IV kriyojelin infrared spektrumu incelendiğinde kolajenden kaynaklı amid I bandı 1658 cm⁻¹ ve amid II bandı 1545 cm⁻¹ görülmüştür. PHEMA'nın yapısında olmayan kolajene özgü olan amid I ve II bantlarının görülmesi kolajenin PHEMA+KOL Tip IV kriyojele yapısına başarılı bir şekilde katıldığını göstermektedir [122].



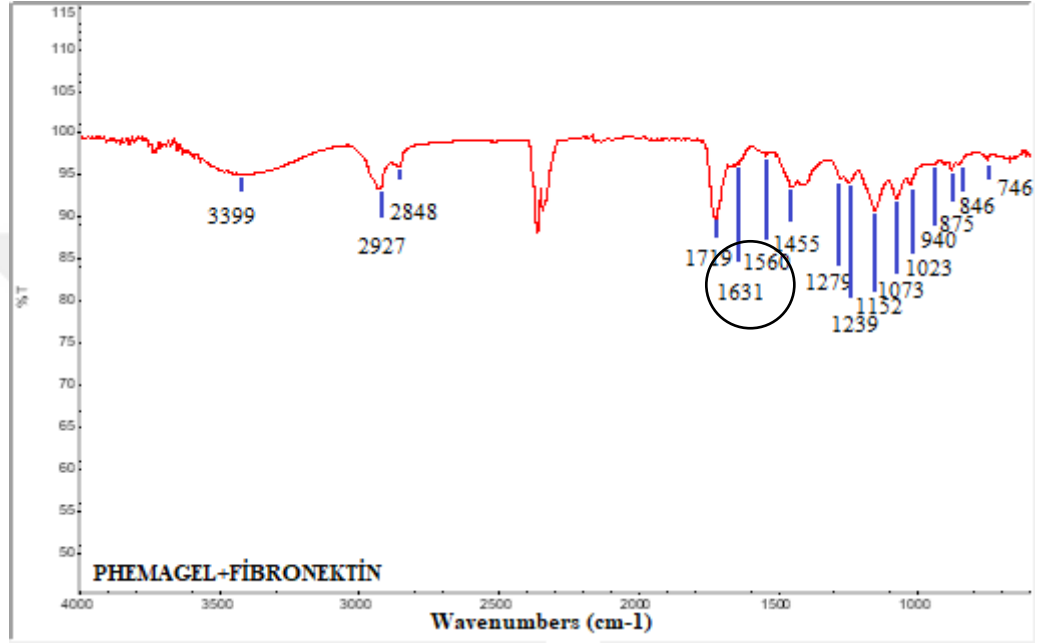
Şekil 4.13. PHEMA+KOL Tip IV kriyojelin FTIR/ATR spektrumu.

PHEMAGEL kriyojelin infrared spektrumu Şekil 4.14'te verilmiştir. Jelatinin yapısından kaynaklı 1640 cm⁻¹'da amid I bandı (C=O gerilme), 1556 cm⁻¹'de amid II bandı (N-H ve C-N gerilme) ve 1277 cm⁻¹'de amid III bandı (C-N ve N-H çift gerilme) görülmektedir. Amid I, II ve III bantlarının varlığı jelatinin PHEMAGEL kriyojel yapısına başarılı bir şekilde katıldığını göstermektedir [123].



Şekil 4.14. PHEMAGEL kriyojelin FTIR/ATR spektrumu.

PHEMAGEL+FN kriyojellerin infrared spektrumu ise Şekil 4.15'te verilmiştir. PHEMAGEL+FN kriyojelin infrared spektrumu incelendiğinde jelatinden kaynaklı amid I ve amid II bantları sırasıyla 1631 cm⁻¹'de (C=O gerilme) ve 1560 cm⁻¹'da (N-H ve C-N gerilme) görülmüştür. Ayrıca amid I ve amid II bantları fibronektin ve jelatinin yapısından kaynaklı ortak banttır [124].

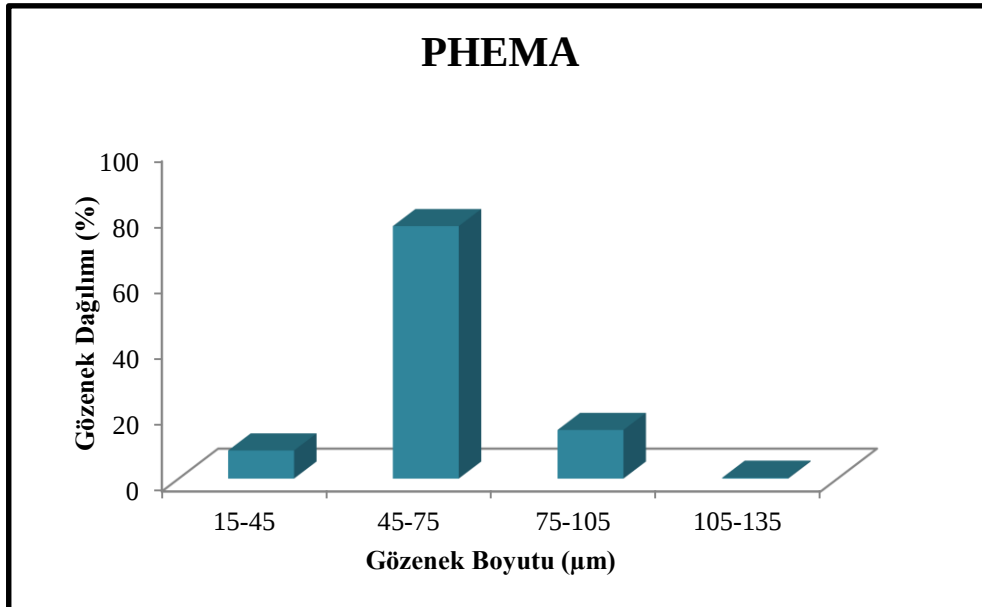


Şekil 4.15. PHEMAGEL+FN kriyojelin FTIR/ATR spektrumu.

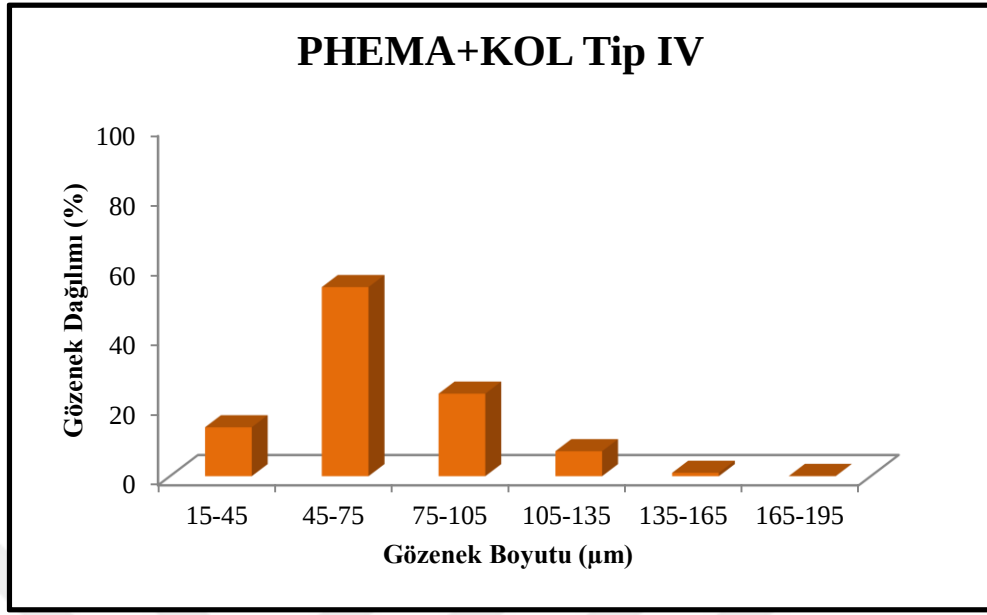
4.4.3. Mikro-CT Analizi

Çalışma kapsamında hazırlanan kriyojellerin gözenek boyutlarını ve gözenek boyutlarının yüzde dağılımlarını değerlendirebilmek için PHEMA, PHEMA+KOL Tip IV, PHEMAGEL ve PHEMAGEL+FN kriyojellere Mikro-CT analizi yapılmıştır. Gözenek boyutu, hücrelerin jellere tutunabilmesinde ve çoğalmasında doğrudan bir etkiye sahiptir. Şekil 4.16'da PHEMA, Şekil 4.17'de PHEMA+KOL Tip IV, Şekil 4.18'de PHEMAGEL ve Şekil 4.19'da PHEMAGEL+FN kriyojellerin gözenek boyutlarının yüzde dağılım grafikleri verilmiştir. Şekil 4.20'de ise A ve A1'de PHEMA, B ve B1'de PHEMA+KOL Tip IV, C ve C1'de PHEMAGEL ve D ve D1'de PHEMAGEL+FN kriyojellerin 3 boyutlu Mikro-CT görüntüleri verilmiştir. Kriyojeller bir X-ışını kaynağı önünde 360° döndürülmüştür ve üç boyutlu görüntüler elde edilmiştir.

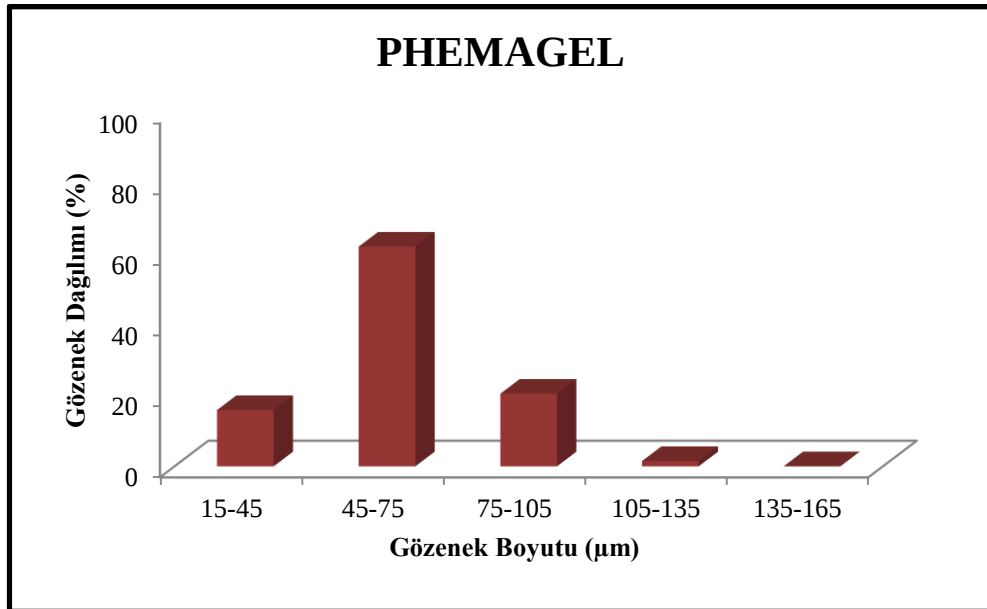
Analiz için kriyojeller 21 mm uzunlukta ve çapı 6 mm olacak şekilde hazırlanmıştır. Mikro-CT örnekleri analiz öncesinde 24 saat liyofilizatörde kurutulmuştur. Analiz sonucunda PHEMA kriyojelin gözenek yüzdesi 57.2, PHEMA+KOL Tip IV kriyojelin 38.3, PHEMAGEL 44.1, PHEMAGEL+FN kriyojelin 28.76 olarak bulunmuştur. Şekil 4.16'da PHEMA kriyojelin gözenek boyutunun yüzde olarak dağılımı verilmiştir ve PHEMA kriyojelin gözenek boyutları 15-135 μm arasında değişmektedir. PHEMA+KOL Tip IV kriyojelin gözenek dağılımı Şekil 4.17'de verilmiştir ve PHEMA+KOL Tip IV kriyojelin gözenek boyutları 15-165 μm arasında değişmektedir. PHEMA+KOL Tip IV kriyojelin gözenek boyutunun PHEMA kriyojelden farklı olarak 165 μm 'ye ulaştığı görülmektedir. PHEMAGEL kriyojelin gözenek dağılımı Şekil 4.18'de verilmiştir ve PHEMAGEL kriyojelin gözenek boyutlarının dağılımı PHEMA+KOL Tip IV kriyojele benzer yüzdelerde ve 15-165 μm arasında değiştiği görülmüştür. PHEMAGEL+FN kriyojelin gözenek dağılımı Şekil 4.19'da verilmiş ve PHEMAGEL+FN kriyojelin gözenek boyutlarının dağılımı diğer kriyojellerden farklı olarak 15-255 μm arasında değiştiği görülmüştür. Kriyojellerin bu farklı gözenek boyutu dağılımının hücrelerin tutunmasında ve çoğalmasına ortam sağlayarak hücre canlılığında artış sağlaması beklenmektedir.



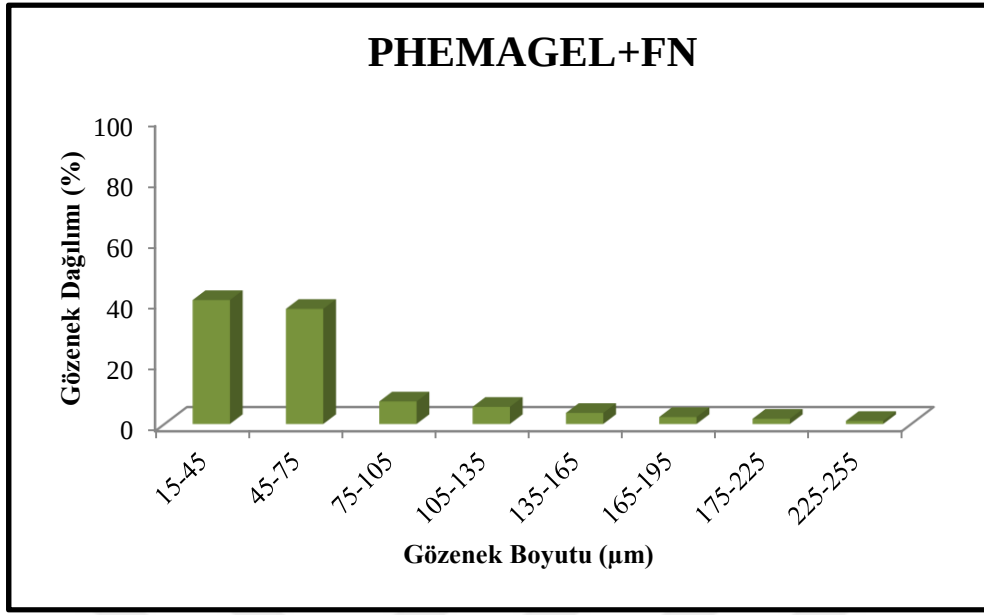
Şekil 4.16. PHEMA kriyojelin Mikro-CT analiz sonuçlarının gözenek boyutuna göre gözenek yüzdesi dağılım grafiği.



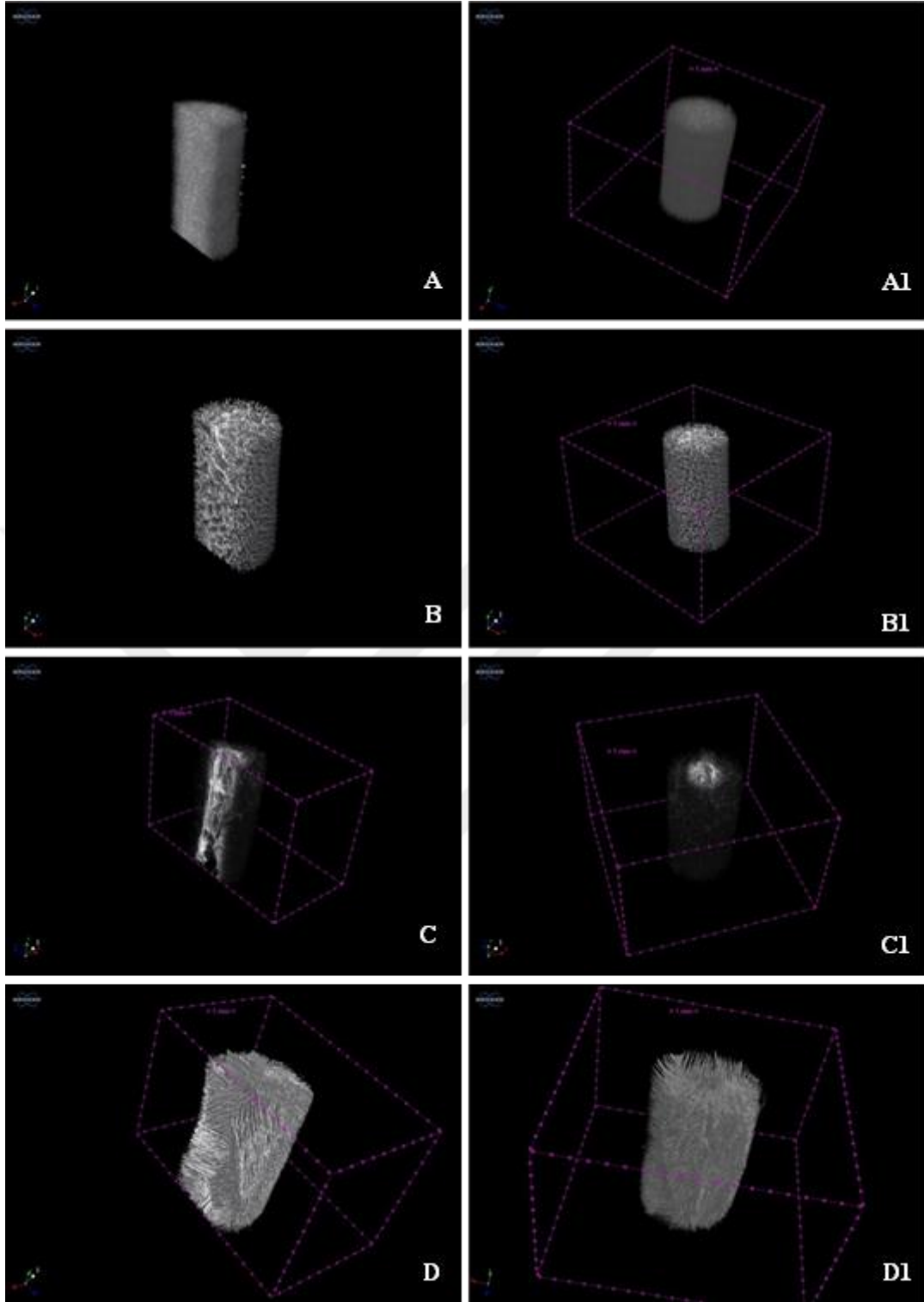
Şekil 4.17. PHEMA+KOL Tip IV kriyojelin Mikro-CT analiz sonuçlarının gözenek boyutuna göre gözenek yüzdesi dağılım grafiği.



Şekil 4.18. PHEMAGEL kriyojelin Mikro-CT analiz sonuçlarının gözenek boyutuna göre gözenek yüzdesi dağılım grafiği.



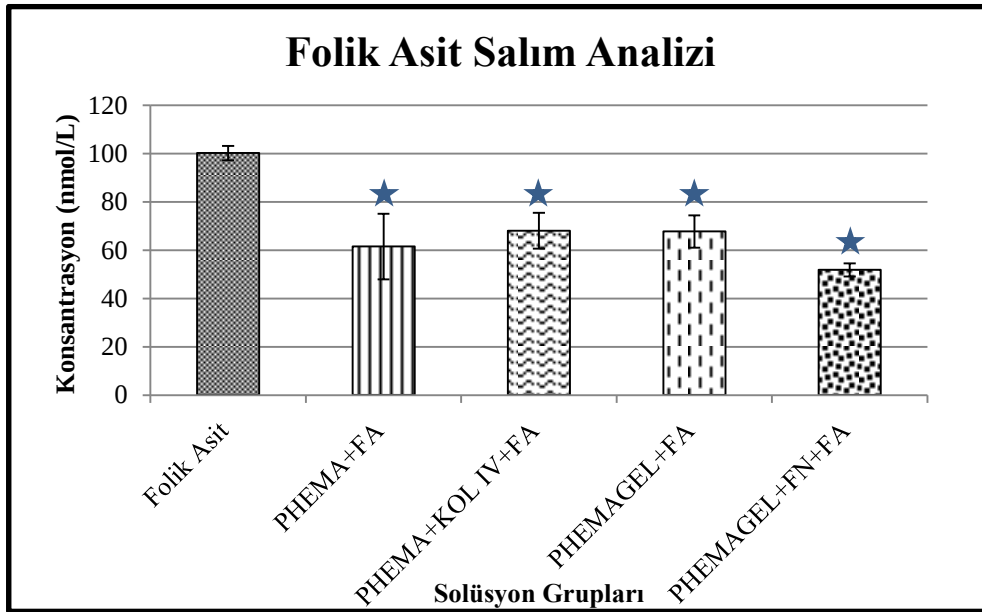
Şekil 4.19. PHEMAGEL+FN kriyojelin Mikro-CT analiz sonuçlarının gözenek boyutuna göre gözenek yüzdesi dağılım grafiği.



Şekil 4.20. A ve A1. PHEMA, B ve B1. PHEMA+KOL Tip IV, C ve C1. PHEMAGEL, D ve D1. PHEMAGEL+FN kriyojellerin üç boyutlu Mikro-CT görüntüleri.

4.5. Folik Asit Miktarının ELISA Ölçüm Sonuçları

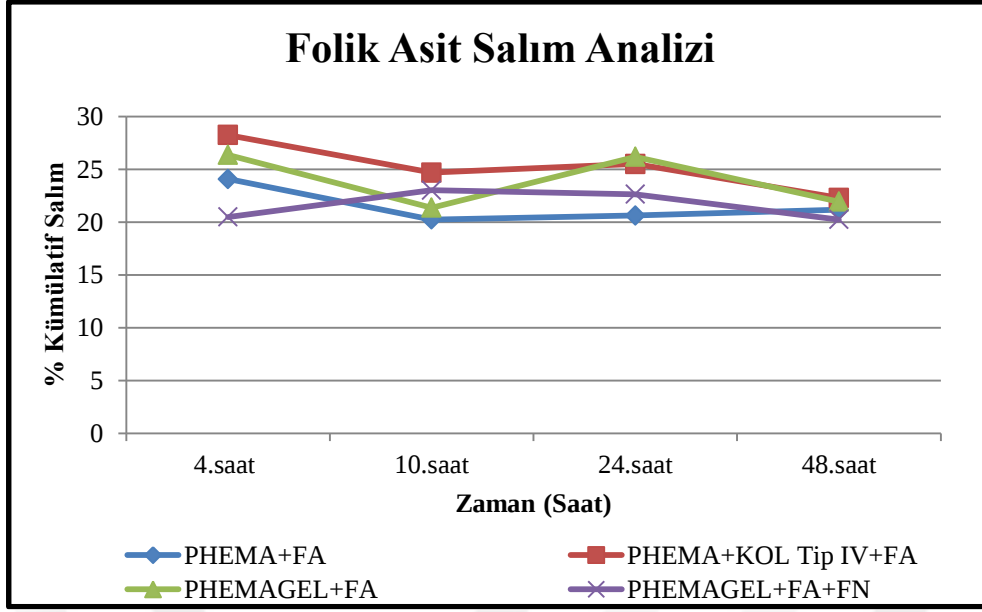
PHEMA temelli sentezlenmiş olan PHEMA+KOL Tip IV, PHEMAGEL ve PHEMAGEL+FN kriyojel gruplarına gebelikte alınması gerekli bir vitamin olan folik asit analizlerden önce bağlanmıştır. Kriyojel diskler hazırlanan folik asit çözeltisi içerisinde 24 saat boyunca bağlanmaya bırakılmıştır. Bağlanma öncesi folik asit çözeltisinden ve 24 saatlik bağlanmadan sonra kriyojel gruplarının folik asit çözeltisinden örnekler alınmıştır ve folik asitin salım davranışı incelenmiştir. Şekil 4.21’de PHEMA temelli hazırlanmış olan kriyojel gruplarına bağlanan folik asitin salım grafiği verilmiştir. Salım sonuçları değerlendirildiğinde bağlanmadan önceki folik asit çözeltisine kıyasla 24 saatlik bağlanmadan sonraki tüm kriyojel gruplarındaki folik asit salımlarının istatistiksel olarak anlamlı derecede az olduğu gözlenmiştir (50-60 nmol/L). PHEMA+KOL Tip IV+FA ve PHEMAGEL+FA kriyojel gruplarındaki folik asit salımlarının aynı değerlerde olduğu görülmektedir. PHEMAGEL+FN+FA kriyojel grubundaki folik asit salımı ise % 50 oranındadır ve diğer kriyojel gruplarına göre daha az folik asit salımı olduğu tespit edilmiştir. Folik asitin kriyojel gruplarına başarılı bir şekilde bağlandığı görülmüştür.



Şekil 4.21. PHEMA temelli hazırlanmış kriyojel gruplarına bağlanan FA solüsyonlarının salım grafiği.

★; Folik asit çözelti grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ($p \leq 0,05$).

Farklı özellikler ile hazırlanmış olan kriyojel gruplarına hücre ekimi serumlu besiyerinde yapılacağından folik asitin *in vitro* salım davranışını belirleyebilmek için folik asit bağlanan kriyojel gruplarının serumlu besiyerindeki salımları incelenmiştir. Kriyojel gruplarının FA *in vitro* salım analizi için, kriyojeller serumlu besiyeri içerisinde 4, 10, 24 ve 48 saat bekletilmiştir salım sonuçları değerlendirilmiştir. PHEMA+FA, PHEMA+KOL IV+FA, PHEMAGEL+FA ve PHEMAGEL+FN+FA kriyojel gruplarının *in vitro* folik asit salımları incelenmiştir. Şekil 4.22’de kriyojel gruplarının artan inkübasyon sürelerine bağlı olarak folik asit salım grafiği verilmiştir. Hücreler için kullanılan DMEM-F12 besiyeri içerisinde FA bulunmaktadır. Bu değer blank olarak kabul edilip tüm değerlerden çıkartılmıştır. Kriyojel gruplarının folik asit salımı incelendiğinde PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojelin 4.saatte % 25-30 arasında olduğu 10.saatte ise % 25’e düştüğü gözlenmiştir. 48.saatte ise % 25’in altına düşmüştür. PHEMAGEL+FA jelin folik asit salımının 4.saatte % 26, 10.saatte ise % 20’ye düştüğü gözlenmiştir. 24.saatte anlamlı olmayan bir artış olmuştur. 48.saatte ise % 20’ye düştüğü görülmüştür. PHEMA+FA jelin folik asit salımı 4.saatte % 24 iken artan inkübasyon saatlerine bağlı olarak folik asit salımında azalma göstermiştir. PHEMAGEL+FN+FA kriyojelin ise 4.saatte % 20, 10.saatte % 23 folik asit salımı incelenmiştir. 48.saatte % 20’ye azaldığı görülmüştür. Folik asitin *in vitro* salımında artan inkübasyon süreleri için tüm kriyojel gruplarının belirli bir seviyede olduğu gözlenmiştir. Tüm kriyojel gruplarının 48.saatteki folik asit salımında azalma olduğu görülmüştür. Kriyojel grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Folik asitin kriyojel gruplarına başarılı bir şekilde bağlandığı ve kriyojellerin folik asiti jel yapısında koruduğu görülmüştür.



Şekil 4.22. Kriyojel gruplarının serumlu besiyeri içerisindeki FA salım grafiği.

4.6. Kriyojel Sisteminde MTT Hücre Canlılık Sonuçları

Üç boyutlu hücre kültür ortamında yeni nesil plasental model oluşturmak amacıyla farklı özellikler ile hazırlanmış olan kriyojel iskeleler kullanılmıştır. Kriyojeller, hücrelerin tutunmasını ve çoğalmasını sağlayabilecek birbirleriyle bağlantılı makro gözeneklerden oluşmaktadırlar. Mekanik olarak dayanıklı ve sağlam yapıda olmaları, biyouyumlu ve hidrofilik özellikte olmaları oluşturulacak plasental model için kriyojellerin bu çalışmada tercih edilmelerini sağlamıştır. Uygun üç boyutlu por yapısına sahip biyouyumlu PHEMA kriyojellere jelatin, fibronektin veya kolajen tip IV ile birlikte folik asit bağlanarak fonksiyon kazandırılmıştır. Farklı özelliklerle hazırlanmış olan kriyojel gruplarına BeWo ve HUVEC hücreleriyle mono ve ortak-kültür sistemleri oluşturulmuştur. Bu çalışmada, hazırlanan farklı özelliklerdeki kriyojellerin hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTT hücre canlılık analizi ile değerlendirilmiştir. Sonrasında ise oluşturulan üç boyutlu plasental kriyojel sistemlerine Vortiooksetin uygulaması yapılarak hücre canlılığı MTT analizi ile değerlendirilmiştir.

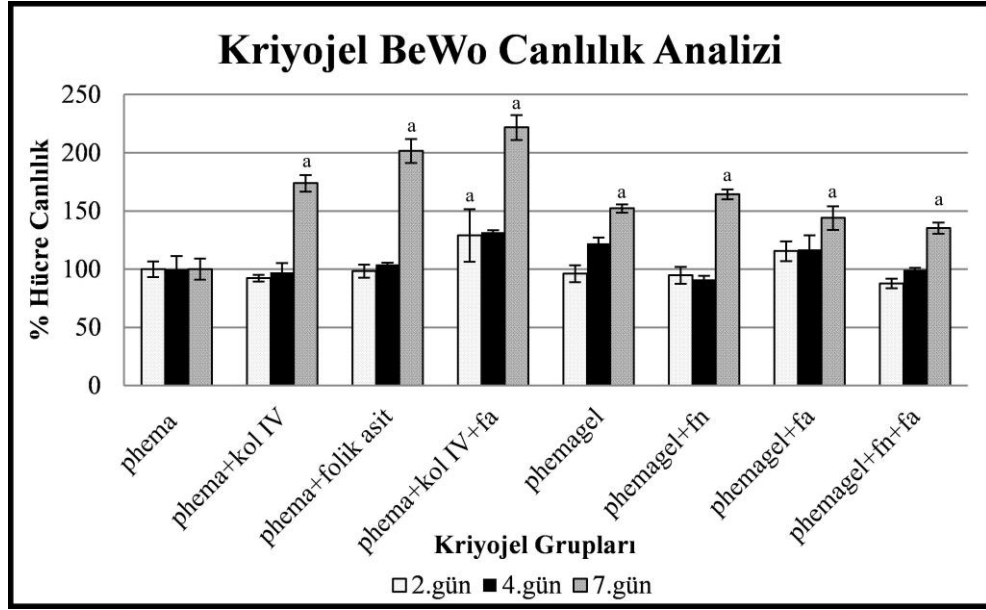
4.6.1. Mono ve Ortak Kültür Gruplarının Canlılık Analizi

PHEMA temelli sentezlenen kriyojellerin yapısına hücrelerin daha iyi tutunabilmesi ve  o alabilmesi için jelatin, fibronektin veya kolajen tip IV eklenerek jellere fonksiyon kazandırılmıştır. Hazırlanan dört farklı kriyojelin polimerizasyon   zeltiilerinde çapraz bağlayıcılar kullanılarak PHEMA, PHEMA+KOL Tip IV, PHEMAGEL ve PHEMAGEL+FN kriyojeller sentezlenmiştir. Bu dört farklı kriyojel grubuna 24 saat boyunca çalkalayıcı üzerinde folik asit ba lanması gerçekleştirilmiştir. Bağlanma sonrası PHEMA+FA, PHEMA+KOL Tip IV+FA, PHEMAGEL+FA ve PHEMAGEL+FN+FA ile birlikte totalde sekiz farklı kriyojel doku iskeleleri sentezlenmiştir. Farklı içerikler ile hazırlanmış olan kriyojel doku iskelelerinin biyouyumlulu unu ve hücrelerin farklı kriyojellerdeki proliferasyon yeteneklerini anlayabilmek için ikilenme zamanları farklı olan BeWo ve HUVEC hücrelerinin mono kültürü ve 3:1 (BeWo-HUVEC) hücre oranının ortak kültürü 2, 4 ve 7.gün MTT canlılık analiz ile incelenmiştir. Analizlerde PHEMA kriyojel kontrol grubu olarak seçilmiştir ve fonksiyon kazandırılan PHEMA+KOL Tip IV, PHEMAGEL, PHEMAGEL+FN PHEMA+FA, PHEMA+KOL Tip IV+FA, PHEMAGEL+FA ve PHEMAGEL+FN+FA kriyojel grupları ile karşılaştırılmıştır.

Farklı içerikler ile hazırlanmış olan kriyojel gruplarına ekilen BeWo hücresinin kontrol grubuna kıyasla 2, 4 ve 7.günlerdeki yüzde hücre canlılık sonuçları  ekil 4.23’de verilmiştir. BeWo hücresinin MTT analiz sonuçlarına göre jelatin, fibronektin, kolajen tip IV ve folik asit ile fonksiyon kazandırılmış kriyojel grupları kontrol grubu olan PHEMA kriyojel ile karşılaştırıldığında özellikle 7.gün için tüm kriyojellerde hücre canlılık yüzdelerinin PHEMA kriyojelin çok fazla üzerinde olduğu görülmüştür. PHEMA+KOL Tip IV, PHEMA+FA, PHEMA+KOL Tip IV+FA, PHEMAGEL, PHEMAGEL+FN, PHEMAGEL+FA ve PHEMAGEL+FN+FA kriyojel gruplarının 7.gündeki hücre canlılıkları PHEMA kriyojele kıyasla istatistiksel olarak önemli derecede artışlar göstermiştir. PHEMA+KOL Tip IV, PHEMA+FA ve özellikle PHEMA+KOL Tip IV+FA jel gruplarının hücre canlılıkları jelatin içeren PHEMAGEL, PHEMAGEL+FN, PHEMAGEL+FA ve PHEMAGEL+FN+FA kriyojel gruplarına kıyasla 7.günde önemli artışlar göstermiştir. Kolajen tip IV’ n ve folik asitin hücre tutunmasını ve çoğalmasını arttırdığı gözlenmiştir.

PHEMA+KOL Tip IV, PHEMA+FA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojellerin hücre canlılıkları incelendiğinde 2.günde PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel kontrol grubundan, PHEMA+KOL Tip IV ve PHEMA+FA jel gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derece artış göstermiştir. 4.günde ise PHEMA+KOL Tip IV ve PHEMA+FA jel gruplarına kıyasla PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojelin hücre canlılığında artış görülmüştür. PHEMA+KOL Tip IV ve PHEMA+FA kriyojelin 2. ve 4.gündeki hücre canlılıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmemiştir. Ancak 7.gündeki hücre canlılık yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmektedir. Jelatin içeren PHEMAGEL, PHEMAGEL+FN, PHEMAGEL+FA ve PHEMAGEL+FN+FA kriyojel gruplarının yüzde hücre canlılıkları değerlendirildiğinde 2.gün hücre canlılığının PHEMAGEL+FA kriyojelde diğer kriyojellere göre yüksek olduğu gözlenmiştir. 4.günde ise PHEMAGEL ve PHEMAGEL+FA kriyojeller hücre canlılıklarında artış göstermiştir. Jelatin içeren kriyojel grupları 7.günde kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermiştir. PHEMAGEL ve PHEMAGEL+FN+FA kriyojel gruplarındaki yüzde hücre canlılığı inkübasyon süresine bağlı olarak doğrusal bir artış göstermektedir.

BeWo hücresinin kolajen tip IV ve folik asit ile fonksiyon kazandırılan PHEMA kriyojelindeki (PHEMA+KOL Tip IV+FA) hücre canlılığı diğer jellere kıyasla inkübasyon sürelerine bağlı olarak en yüksek yüzdeyi vermiştir. Elde edilen sonuçlara göre hücre tutunmasında ve çoğalmasında en uygun içeriğe sahip PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel bulunmuştur.



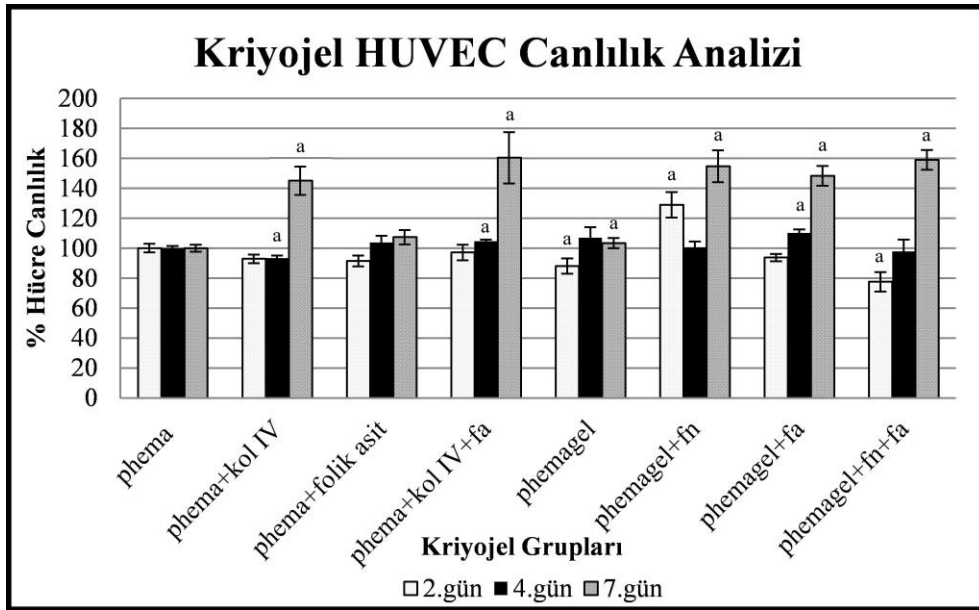
Şekil 4.23. Kriyojel gruplarındaki BeWo hücrelerinin 2. 4. ve 7.gün canlılık yüzdeleri.

a; PHEMA kriyojel grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ($p \leq 0,05$).

Kriyojel gruplarına ekilen HUVEC hücrelerinin 2, 4 ve 7.günlerdeki yüzde hücre canlılık MTT sonuçları Şekil 4.24'te verilmiştir. Hücre canlılığı inkübasyon süresine bağlı olarak özellikle 7.günde jelatin, fibronektin, kolajen tip IV ve folik asit ile fonksiyon kazandırılmış kriyojel gruplarında kontrol grubu olan PHEMA kriyojele kıyasla önemli artış göstermiştir. PHEMA+KOL Tip IV, PHEMA+KOL Tip IV+FA, PHEMAGEL+FN, PHEMAGEL+FA ve PHEMAGEL+FN+FA kriyojel gruplarının 7.gün hücre canlılıklarında istatistiksel olarak önemli derecede artışlar gözlenmiştir.

PHEMA+KOL Tip IV, PHEMA+FA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojellerin MTT analizi sonuçları değerlendirildiğinde 2.gün hücre canlılıklarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Kontrol grubu PHEMA kriyojele göre PHEMA+KOL Tip IV kriyojelin 4.gün hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür. PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojelin 4.gün hücre canlılığı ise kontrol grubu kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. PHEMA+KOL Tip IV ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel gruplarının yüzde hücre canlılığı kontrol grubu ve PHEMA+FA kriyojele göre 7.günde istatistiksel olarak önemli derecede artış göstermektedir.

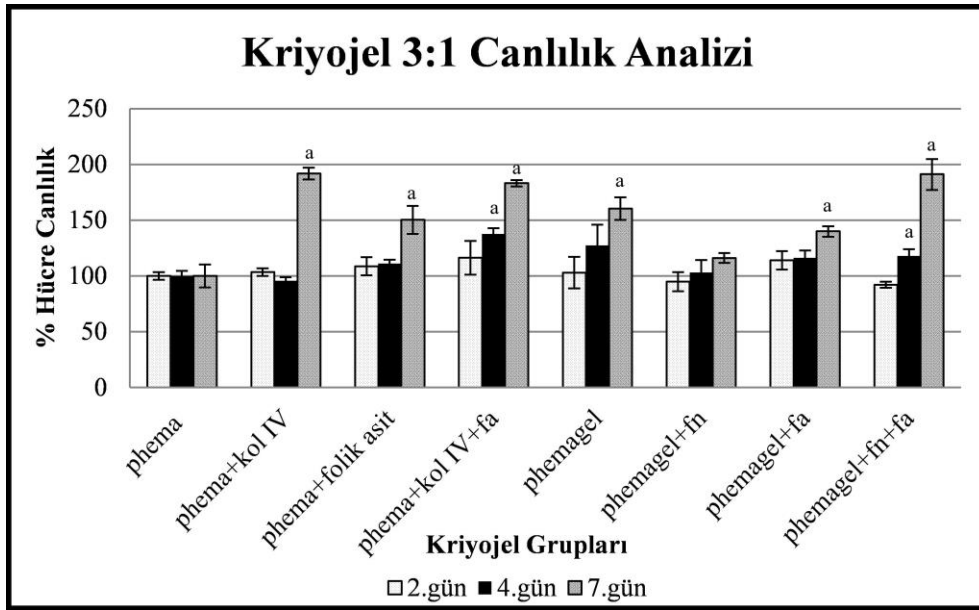
Jelatin içeren PHEMAGEL, PHEMAGEL+FN, PHEMAGEL+FA ve PHEMAGEL+FN+FA kriyojel gruplarının yüzde hücre canlılıkları değerlendirildiğinde 2.gün PHEMAGEL ve PHEMAGEL+FN+FA kriyojellerin hücre canlılıklarında PHEMA kriyojele göre istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir. PHEMAGEL+FA kriyojel 2.gün hücre canlılığında azalma göstermiştir ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. PHEMAGEL+FN kriyojel ise 2.gün hücre canlılığında kontrol grubuna, PHEMAGEL, PHEMAGEL+FA, PHEMAGEL+FN+FA kriyojel gruplarına ve jelatin içermeyen kriyojel gruplarına (PHEMA+KOL Tip IV, PHEMA+FA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermektedir. 4.günde PHEMAGEL+FA kriyojel grubu hücre canlılığında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artış göstermiştir. Jelatin içeren PHEMAGEL, PHEMAGEL+FN, PHEMAGEL+FA ve PHEMAGEL+FN+FA kriyojel gruplarının 7.gün hücre canlılıkları PHEMA'ya göre istatistiksel olarak önemli derece artış gösterdiği belirlenmiştir. PHEMA+KOL IV+FA ve PHEMAGEL+FN+FA kriyojel gruplarında inkübasyon sürelerine bağlı olarak doğrusal bir artış ve 7.gün hücre canlılıklarının diğer jellere kıyasla anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür. HUVEC hücresinin fibronektin, kolajen tip IV ve folik asit ile fonksiyon kazandırılarak sentezlenen kriyojel gruplarında hücre canlılığını koruduğu ve çoğaldığı görülmüştür.



Şekil 4.24. Kriyojel gruplarındaki HUVEC hücresinin 2. 4. ve 7.gün canlılık yüzdeleri.

a; PHEMA kriyojel grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ($p \leq 0,05$).

Hazırlanan kriyojel gruplarına ekilen 3:1 (BeWo-HUVEC) hücre oranının 2, 4 ve 7.günlerdeki yüzde hücre canlılık MTT analiz sonuçları Şekil 4.25'te verilmiştir. Hücre canlılığı inkübasyon süresine bağlı olarak özellikle 7.günde jelatin, fibronektin, kolajen tip IV ve folik asit ile fonksiyon kazandırılmış kriyojel gruplarında kontrol grubu olan PHEMA kriyojele kıyasla önemli artış göstermiştir. PHEMA+KOL Tip IV, PHEMA+FA, PHEMA+KOL Tip IV+FA, PHEMAGEL, PHEMAGEL+FA ve PHEMAGEL+FN+FA kriyojel gruplarının 7.gün hücre canlılıklarında istatistiksel olarak önemli derecede artışlar gözlenmiştir. Jelatin içermeyen PHEMA+KOL Tip IV, PHEMA+FA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel gruplarının MTT analizi yüzde hücre canlılık sonuçları değerlendirildiğinde kriyojel gruplarının 2.gün hücre canlılıklarında artış görünse de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel grubunun 4.gün hücre canlılığında kontrol grubu, PHEMA+KOL Tip IV ve PHEMA+FA kriyojellere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artış görülmüştür. 7.gün hücre canlılığı PHEMA+KOL Tip IV, PHEMA+FA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojellerde PHEMA kriyojele göre istatistiksel olarak önemli derecede artmıştır. PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojelin 3:1 hücre oranında hücre canlılığı inkübasyon süresine bağlı olarak doğrusal bir artış göstermiştir. Kolajen tip IV ve folik asitin hücre tutunması ve çoğalması üzerinde arttırıcı etkisi olduğu gözlenmiştir. Jelatin içeren PHEMAGEL, PHEMAGEL+FN, PHEMAGEL+FA ve PHEMAGEL+FN+FA kriyojel gruplarının yüzde hücre canlılıkları incelendiğinde 2.gün hücre canlılığı kontrol grubuna göre PHEMAGEL ve PHEMAGEL+FA kriyojel gruplarında artma, PHEMAGEL+FN ve PHEMAGEL+FN+FA kriyojellerde ise azalma göstermiştir ancak sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. PHEMAGEL+FN+FA kriyojelin 4.gün hücre canlılığında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artış gözlenmiştir. 7.gün hücre canlılığı PHEMAGEL, PHEMAGEL+FA ve PHEMAGEL+FN+FA kriyojel gruplarında PHEMA'ya kıyasla istatistiksel olarak önemli derecede artış göstermiştir. Özellikle PHEMA+KOL Tip IV, PHEMA+KOL Tip IV+FA ve PHEMAGEL+FN+FA kriyojel grupları 7.günde en yüksek hücre canlılık yüzdelerini vermiştir. Plasental hücreler kullanılarak 3:1 (BeWo-HUVEC) hücre oranı ile fibronektin, kolajen tip IV ve folik asitle fonksiyon kazandırılarak sentezlenen kriyojel grupları ile oluşturulan plasental modellerin *in vivo*ya daha yakın sistemler olmaları beklenmiştir. Kriyojel gruplarındaki hücre canlılığının 7.güne kadar korunduğu ve çoğaldığı görülmüştür.



Şekil 4.25. Kriyojel gruplarındaki 3:1 hücre oranının 2. 4. ve 7.gün canlılık yüzdeleri.

a; PHEMA kriyojel grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ($p \leq 0,05$).

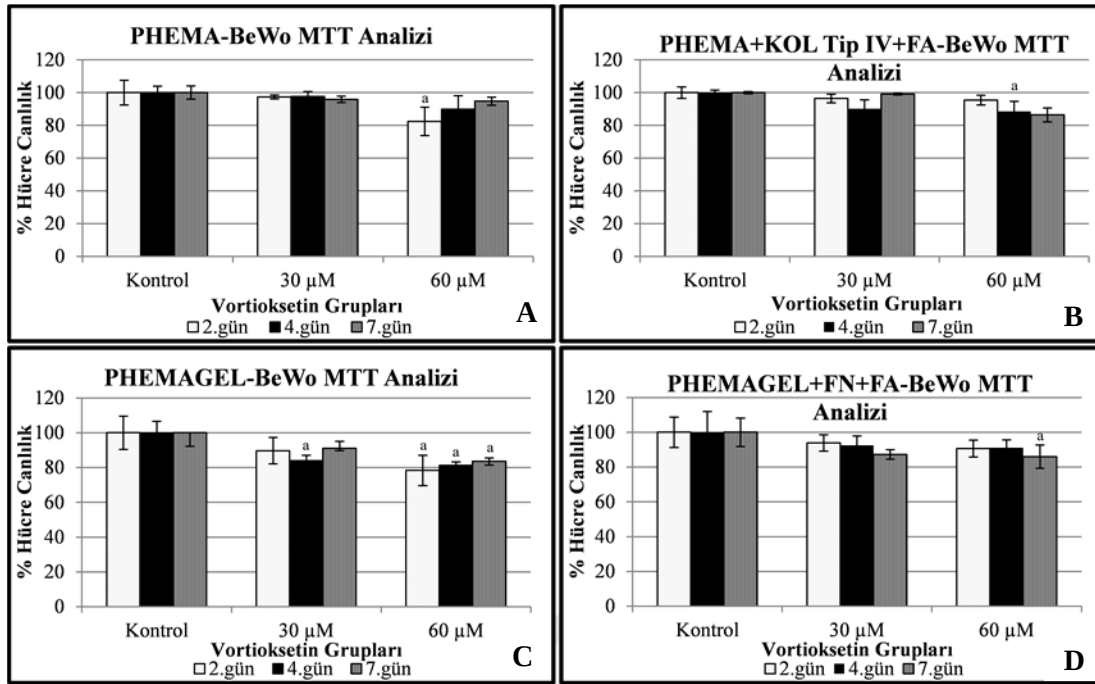
4.6.2. Mono ve Ortak Kültür Gruplarına Vortiooksetin Uygulamasının Canlılık Analizi

Çeşitli özellikler ile oluşturan sekiz farklı kriyojel grubunun MTT hücre canlılık sonuçları değerlendirildiğinde hücre canlılığının inkübasyon süresine bağlı olarak korunduğu ve artışın olduğu gruplar (PHEMA, PHEMA+KOL Tip IV+FA, PHEMAGEL, PHEMAGEL+FN+FA) seçilerek Vortiooksetin uygulamasının yapılmasına karar verilmiştir. Vortiooksetin PHEMA, PHEMA+KOL Tip IV+FA, PHEMAGEL ve PHEMAGEL+FN+FA kriyojel gruplarına BeWo ve HUVEC hücrelerinin mono ve 3:1 hücre oranının ortak kültürü ile Vortiooksetin uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkileri MTT hücre canlılık analizi ile ilk kez bu tez kapsamında incelenmiştir.

Vortiooksetin uygulanan mono ve ortak kültürdeki hücrelerin kriyojel gruplarındaki yüzde hücre canlılık grafikleri ayrı bir şekilde verilmiştir. Kontrol PHEMA ve DMSO gruplarının 2, 4 ve 7.gün sonundaki hücre canlılıkları incelenmiştir ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadığı için grafiklerde DMSO grubuna yer verilmemiştir. Farklı özellikler ile hazırlanmış olan kriyojel gruplarına ekilen BeWo hücrelerine Vortiooksetin uygulaması sonrası 2, 4 ve 7.günlerdeki yüzde hücre canlılık sonuçları Şekil 4.26'da verilmiştir.

PHEMA kriyojel grubu incelendiğinde, 30 μ M Vortioksetin doz grubunun kontrol grubuna göre 2, 4 ve 7.gün BeWo hücreesindeki canlılık yüzdesinde istatistiksel olarak bir azalma görülmemiştir. 60 μ M Vortioksetin doz grubunun 2.gün BeWo hücreesindeki canlılık yüzdesi kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir. 60 μ M Vortioksetin doz grubu 4. ve 7.günlerde 2.güne kıyasla hücre canlılığında artış göstermiştir ancak anlamlı bulunmamıştır. PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel grubunun Vortioksetin dozları incelendiğinde 2.gün 30 μ M ve 60 μ M Vortioksetin doz gruplarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 4.gün 30 μ M ve 60 μ M Vortioksetin doz gruplarında kontrol grubuna kıyasla azalma görülmüştür. Ancak 4.gün 60 μ M Vortioksetin doz grubunun kontrole kıyasla olan hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

7.gün 60 μ M Vortioksetin doz grubunun hücre canlılığı kontrol grubuna ve 30 μ M doza göre azalmıştır. PHEMAGEL kriyojel grubundaki hücre canlılıkları değerlendirildiğinde 2.gün 60 μ M Vortioksetin doz grubunda kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı derece azalma görülmüştür. 4.gün 30 μ M ve 60 μ M Vortioksetin doz gruplarındaki hücre canlılığı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derece azalma göstermiştir. 60 μ M Vortioksetin doz grubunun 7.gün hücre canlılığı kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. PHEMAGEL+FN+FA kriyojel grubunun BeWo hücreisinin yüzde canlılığı incelendiğinde 30 μ M ve 60 μ M Vortioksetin doz gruplarının 2. ve 4.gün hücre canlılığı kontrol grubuna göre azalmıştır. Ancak istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermemiştir. 7.gün 60 μ M Vortioksetin doz grubunun hücre canlılığı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma göstermiştir. Kriyojel gruplarındaki BeWo hücreisinin hücre canlılığı doza ve inkübasyon sürelerine bağlı olarak anlamlı bir azalma göstermemiştir. Hücre canlılığı % 20 kadar azalmıştır.

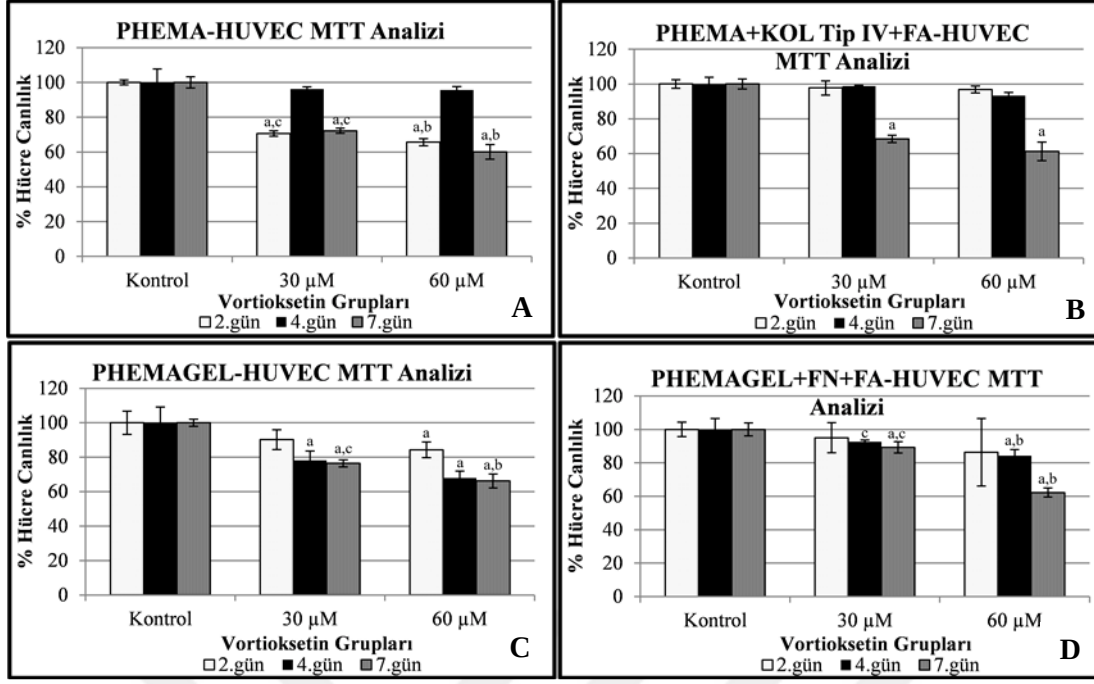


Şekil 4.26. A. PHEMA, B. PHEMA+KOL Tip IV+FA, C. PHEMAGEL, D. PHEMAGEL+FN+FA kriyojel gruplarındaki BeWo hücrelerine Vortioxetin uygulamasının 2. 4. ve 7.gün sonrası hücre canlılık yüzdeleri.

a; Kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ($p \leq 0,05$), b; 30 µM Vortioxetin doz grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ($p \leq 0,05$), c; 60 µM Vortioxetin doz grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ($p \leq 0,05$).

Farklı özellikler ile hazırlanmış olan kriyojel gruplarına ekilen HUVEC hücrelerine Vortioxetin uygulaması sonrası 2, 4 ve 7.günlerdeki yüzde hücre canlılık sonuçları Şekil 4.27’de verilmiştir. PHEMA kriyojeldeki HUVEC hücrelerinin yüzde canlılığı incelendiğinde 2.gün 30 µM Vortioxetin doz grubundaki hücre canlılığı kontrol ve 60 µM Vortioxetin doz gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma göstermiştir. 2.gün 60 µM Vortioxetin doz grubundaki hücre canlılığı kontrol ve 30 µM Vortioxetin doz gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma göstermiştir. 30 µM ve 60 µM Vortioxetin doz gruplarının 4.gün hücre canlılığında artış gözlenmiştir. 7.gün 30 µM Vortioxetin doz grubundaki hücre canlılığı kontrol ve 60 µM Vortioxetin doz gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma göstermiştir. 7.gün 60 µM Vortioxetin doz grubundaki hücre canlılığı kontrol ve 30 µM Vortioxetin doz gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır.

PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel grubunun Vortioksetin dozları incelendiğinde 2. ve 4.gün 30 μ M ve 60 μ M Vortioksetin doz gruplarındaki hücre canlılığı azalma göstermiştir ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 30 μ M ve 60 μ M Vortioksetin doz gruplarının 7.gün hücre canlılıklarındaki azalma kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. PHEMAGEL kriyojel grubundaki hücre canlılıkları değerlendirildiğinde 2.gün 60 μ M Vortioksetin doz grubundaki hücre canlılığı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. 30 μ M ve 60 μ M Vortioksetin doz gruplarının kontrol grubuna kıyasla 4.gün hücre canlılıklarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 7.gün 30 μ M Vortioksetin doz grubundaki hücre canlılığı kontrol ve 60 μ M Vortioksetin doz gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunmuştur. 7.gün 60 μ M Vortioksetin doz grubundaki hücre canlılığı kontrol ve 30 μ M Vortioksetin doz gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. PHEMAGEL+FN+FA kriyojel grubunun HUVEC hücresinin yüzde canlılığı incelendiğinde 30 μ M ve 60 μ M Vortioksetin doz gruplarının 2.gün hücre canlılığı kontrol grubuna göre azalmıştır ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 4.gün 60 μ M Vortioksetin doz grubundaki hücre canlılığı kontrol ve 30 μ M Vortioksetin doz gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. 4.gün 30 μ M Vortioksetin doz grubundaki hücre canlılığı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. 7.gün 60 μ M Vortioksetin doz grubundaki hücre canlılığı kontrol ve 30 μ M Vortioksetin doz gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma göstermiştir. Kriyojel gruplarındaki HUVEC hücresinin hücre canlılığı % 40 kadar azalmıştır.

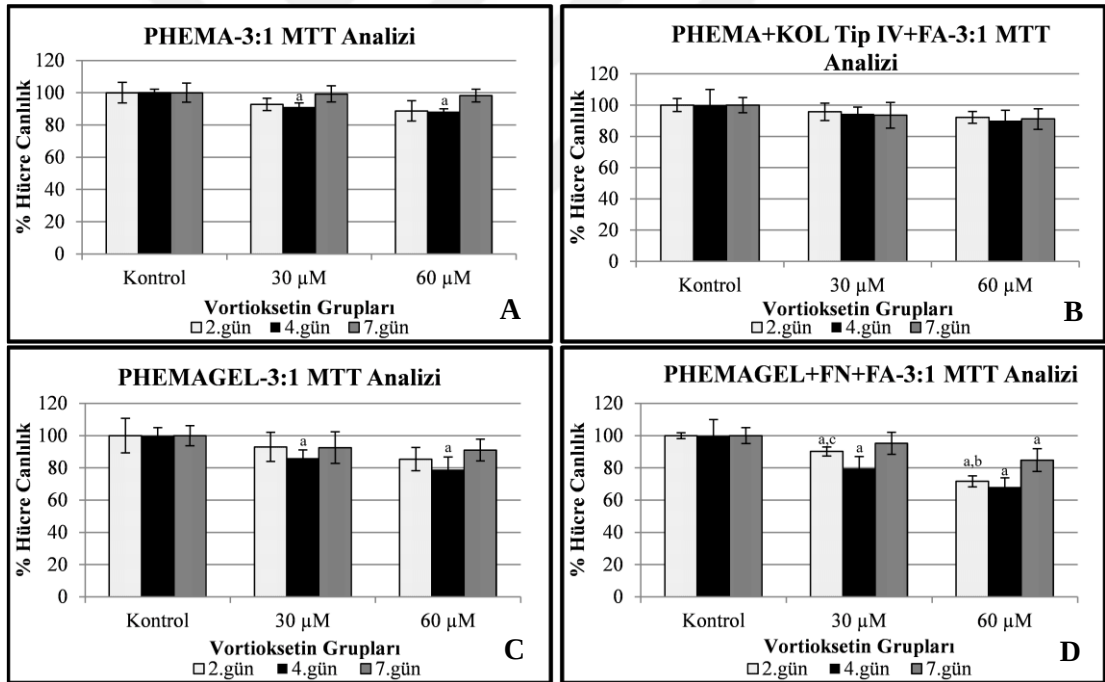


Şekil 4.27. A. PHEMA, B. PHEMA+KOL Tip IV+FA, C. PHEMAGEL, D. PHEMAGEL+FN+FA kriyojel gruplarındaki HUVEC hücrelerine Vortioxetin uygulamasının 2. 4. ve 7.gün sonrası hücre canlılık yüzdeleri.

a; Kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ($p \leq 0,05$), b; 30 µM Vortioxetin doz grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ($p \leq 0,05$), c; 60 µM Vortioxetin doz grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ($p \leq 0,05$).

Hazırlanmış olan kriyojel gruplarına ekilen 3:1 hücre oranına Vortioxetin uygulaması sonrası 2, 4 ve 7.günlerdeki yüzde hücre canlılık sonuçları Şekil 4.28’de verilmiştir. PHEMA kriyojeldeki 3:1 hücre oranının yüzde canlılığı incelendiğinde 2.gün 30 µM ve 60 µM Vortioxetin doz gruplarındaki hücre canlılığı azalma göstermiştir ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 4.gün 30 µM ve 60 µM Vortioxetin doz gruplarındaki hücre canlılığı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma göstermiştir. 7.gün 30 µM ve 60 µM Vortioxetin doz gruplarındaki hücre canlılığı 2. ve 4.güne göre artış göstermiştir. PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel grubunun Vortioxetin dozları incelendiğinde 2, 4 ve 7.gün 30 µM ve 60 µM Vortioxetin doz gruplarındaki hücre canlılığı azalma göstermiştir ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. PHEMAGEL kriyojel grubundaki hücre canlılıkları değerlendirildiğinde 2.gün 30 µM ve 60 µM Vortioxetin doz grubundaki hücre canlılığı kontrol grubuna göre azalmıştır ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

4.gün 30 μ M ve 60 μ M Vortioksetin doz grubundaki hücre canlılığı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma göstermiştir. 7.gün 30 μ M ve 60 μ M Vortioksetin doz grubundaki hücre canlılığı 4.güne göre artış, kontrole göre azalma göstermiştir. Ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. PHEMAGEL+FN+FA kriyojel grubunun 3:1 hücre oranının yüzde canlılığı incelendiğinde 2.gün 30 μ M Vortioksetin doz grubu kontrol grubuna göre 60 μ M Vortioksetin doz grubu ise kontrol ve 30 μ M Vortioksetin doz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma göstermiştir. 4.gün 30 μ M ve 60 μ M Vortioksetin doz grubundaki hücre canlılığı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma göstermiştir. 60 μ M Vortioksetin doz grubu 7.günde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir. Kriyojel gruplarındaki 3:1 hücre oranının hücre canlılığı % 20 kadar azalma göstermiştir.



Şekil 4.28. A. PHEMA, B. PHEMA+KOL Tip IV+FA, C. PHEMAGEL, D. PHEMAGEL+FN+FA kriyojel gruplarındaki 3:1 hücre oranına Vortioksetin uygulamasının 2. 4. ve 7.gün sonrası hücre canlılık yüzdeleri.

a; Kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ($p \leq 0,05$), b; 30 μ M Vortioksetin doz grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ($p \leq 0,05$), c; 60 μ M Vortioksetin doz grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ($p \leq 0,05$).

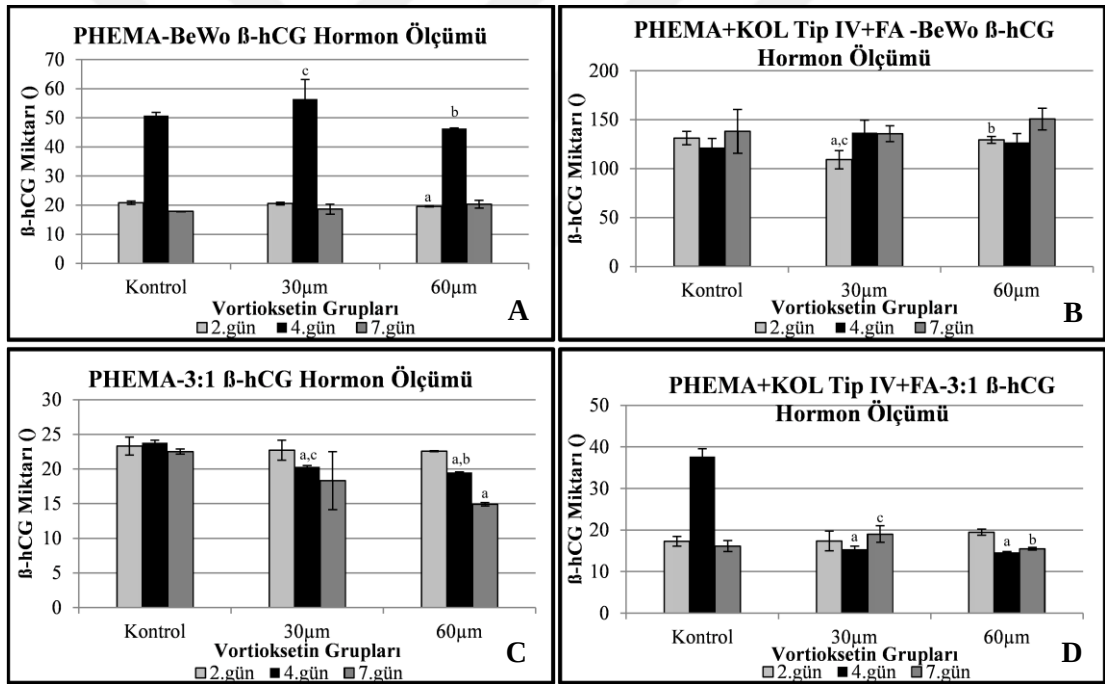
Kriyojel doku iskelelerine ekilen BeWo ve HUVEC hücreleriyle oluşturulan plasenta modellerine Vortiksetin uygulaması sonrası mono ve ortak kültürlerin hücre canlılıkları incelenmiştir. Analiz sonuçları değerlendirildiğinde PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel grubundaki BeWo ve 3:1 hücre oranının yüzde canlılık değişimlerinde doza bağlı olarak önemli azalmalar görülmemiştir. Hücrelerin canlılıklarını koruduğu gözlenmiştir. Bu durum tez kapsamında sentezlenmiş olan farklı özellikteki kriyojel grupları arasından PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojelin plasental model olarak en ideal kriyojel grubu olduğunu göstermiştir.

4.7. β -hCG Hormon Seviyelerinin Sonuçları

Hamileliğin temel hormonu olan β -hCG hormonu trofoblast hücrelerden salgılanmaktadır. Tez kapsamında kullanılan BeWo (trofoblast) hücresinin mono kültür ve 3:1 (BeWo-HUVEC) hücre oranı ile ortak kültüründeki β -hCG hormonu üretimi PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojellerde incelenmiştir.

Vortiksetin dozları uygulanan BeWo ve 3:1 hücre oranının PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel gruplarındaki β -hCG hormon seviyeleri Şekil 4.29’de verilmiştir. BeWo hücresinin PHEMA kriyojeldeki β -hCG hormon miktarı 60 μ M Vortiksetin doz grubunun 2.gün hormon miktarı kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir. 4.gün 60 μ M Vortiksetin doz grubu 30 μ M doz grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir. 7.gün 30 μ M ve 60 μ M’lık Vortiksetin dozları kontrol grubuna göre artış göstermiştir ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 7.günde kontrol ve doz grupları arasında fark görülmemiştir. BeWo hücresinin PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojeldeki hormon miktarları incelendiğinde 2.gün 30 μ M Vortiksetin dozu kontrol grubu ve 60 μ M Vortiksetin dozuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma göstermiştir. 60 μ M Vortiksetin dozu ise 30 μ M Vortiksetin dozuna kıyasla hormon miktarında anlamlı artış göstermiştir. 4. ve 7.günde kontrol ve doz grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

3:1 hücre oranının PHEMA kriyojeldeki β -hCG hormon miktarı kontrol ve doz grupları arasında 2.gün için istatistiksel olarak fark görülmemiştir. 4.günde 30 μ M Vortioksetin dozu kontrol grubuna, 60 μ M Vortioksetin dozu ise kontrol ve 30 μ M Vortioksetin dozuna istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma göstermiştir. 60 μ M Vortioksetin dozunun 7.gününde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmektedir. 30 μ M Vortioksetin dozunda da kontrol grubunda azalma görülmüştür ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Şekil 29'da 3:1 hücre oranının PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojeldeki β -hCG hormon miktarı 2.günde kontrol ve doz grupları arasında istatistiksel olarak fark göstermemiştir. 4.gün 60 μ M ve 30 μ M Vortioksetin dozları kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma göstermiştir. 7.gün 60 μ M Vortioksetin dozu 30 μ M Vortioksetin dozuna göre anlamlı bir azalma göstermiştir.



Şekil 4.29. A. PHEMA ve B. PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel gruplarında BeWo, C. PHEMA ve D. PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel gruplarına ise 3:1 ortak kültür grubunun 2. 4. ve 7. gün Vortioksetin uygulaması sonrası β -hCG hormon seviyelerinin ölçümü.

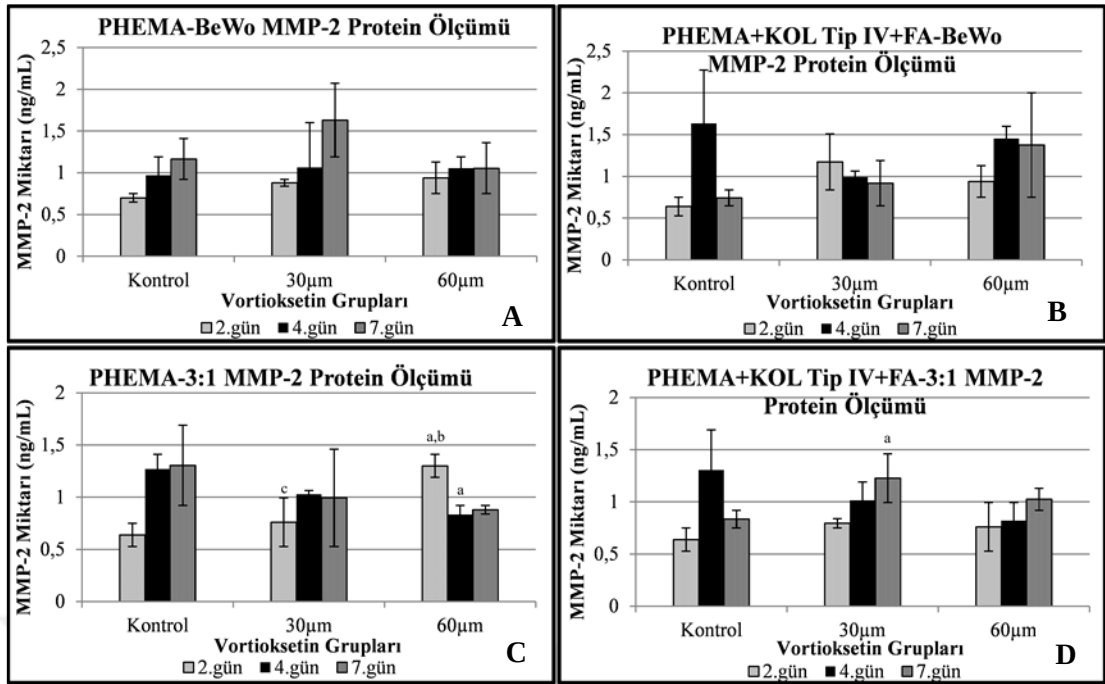
a; Kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ($p \leq 0,05$), b; 30 μ M Vortioksetin doz grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ($p \leq 0,05$), c; 60 μ M Vortioksetin doz grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ($p \leq 0,05$).

4.8. MMP-2 ve MMP-9 Protein Seviyelerinin Belirlenmesi

Hamileliğin başlangıcında ve devamında temel olan MMP-2 ve MMP-9 proteinleri trofoblast ve vasküler endotel hücreler tarafından salgılanmaktadır. Tez kapsamında kullanılan BeWo (trofoblast) hücresinin mono kültürü ve 3:1 (BeWo-HUVEC) hücre oranı ile ortak kültüründeki MMP-2 ve MMP-9 protein seviyeleri PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojellerde incelenmiştir.

Vortioksetin dozları uygulanan BeWo ve 3:1 hücre oranının PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel gruplarındaki MMP-2 protein seviyeleri Şekil 4.30'te verilmiştir. BeWo hücresinin PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel gruplarındaki MMP-2 protein miktarları kontrol grupları ve 30 µM ile 60 µM Vortioksetin dozları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

3:1 hücre oranının PHEMA kriyojeldeki MMP-2 protein miktarı 2.gün 60 µM Vortioksetin doz grubu kontrol ve 30 µM Vortioksetin doz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermiştir. 4.gün 60 µM Vortioksetin doz grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma görülmüştür. 7.günde kontrol ve doz grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. 3:1 hücre oranının PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojeldeki MMP-2 protein miktarı 2. ve 4.günde gruplar arasında anlamlı bir fark yoktur. 7.günde ise 30 µM Vortioksetin doz grubu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir.

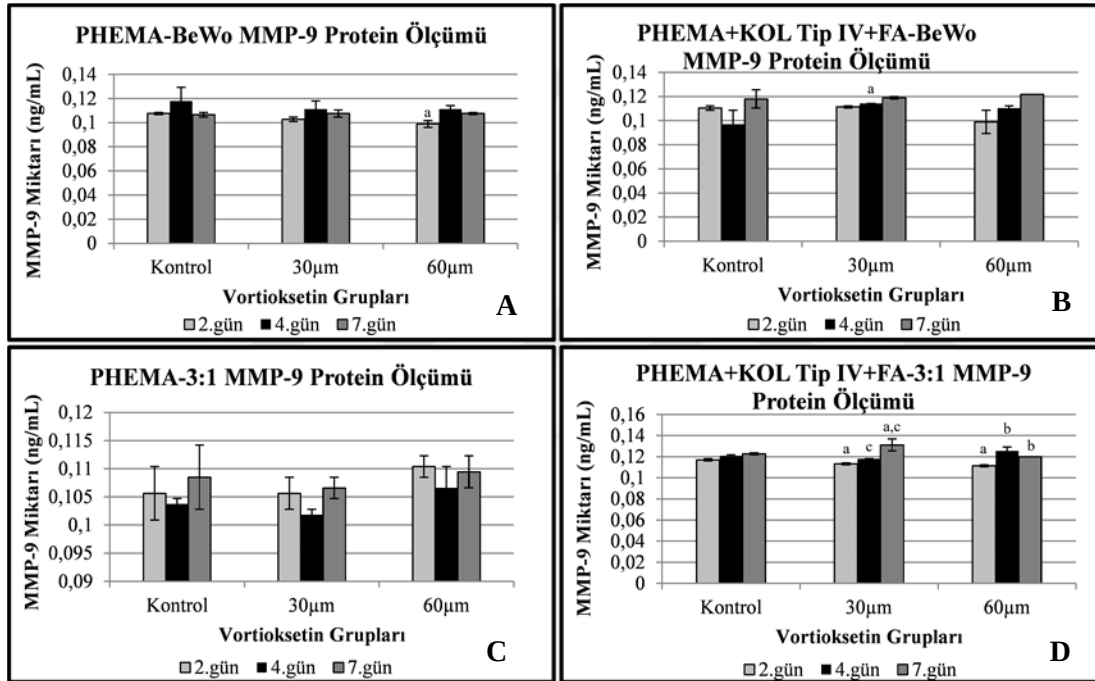


Şekil 4.30. A. PHEMA ve B. PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel gruplarında BeWo, C. PHEMA ve D. PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel gruplarına ise 3:1 ortak kültür grubunun 2. 4. ve 7. gün Vortioxetin uygulaması sonrası MMP-2 protein seviyelerinin ölçümü.

a; Kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ($p \leq 0,05$), b; 30 µM Vortioxetin doz grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ($p \leq 0,05$), c; 60 µM Vortioxetin doz grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ($p \leq 0,05$).

Vortioxetin dozları uygulanan BeWo ve 3:1 hücre oranının PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel gruplarındaki MMP-9 protein seviyeleri Şekil 4.31’te verilmiştir. BeWo hücresinin PHEMA kriyojeldeki MMP-9 protein miktarı 60 µM Vortioxetin doz grubunun 2.gün protein miktarı kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir. 4. ve 7.gün MMP-9 protein seviyesinde kontrol ve doz grupları arasında istatistiksel olarak fark görülmemiştir. BeWo hücresinin PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojeldeki protein miktarları incelendiğinde 2.günde gruplar arasında fark görülmemiştir. 4.gün 30 µM Vortioxetin dozu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermiştir. 7.gün MMP-9 protein seviyesinde kontrol ve doz grupları arasında istatistiksel olarak fark görülmemiştir.

3:1 hücre oranının PHEMA kriyojeldeki MMP-9 protein miktarları kontrol grupları ve 30 μ M ile 60 μ M Vortiksetin dozları arasında inkübasyona bağlı olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. 3:1 hücre oranının PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojeldeki MMP-9 protein miktarı 2.gün 30 μ M ve 60 μ M Vortiksetin dozlarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmektedir. 60 μ M Vortiksetin dozu 4.günde 30 μ M Vortiksetin dozuna göre anlamlı bir artış göstermiştir. 7.gün 30 μ M Vortiksetin dozu kontrol grubuna göre artış, 60 μ M Vortiksetin dozu ise 30 μ M Vortiksetin dozuna göre istatistiksel olarak azalma göstermiştir.



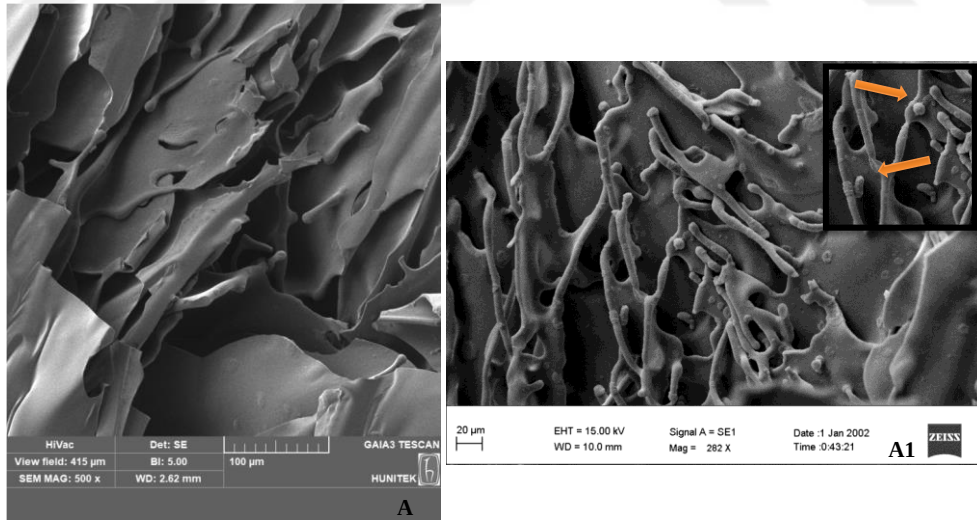
Şekil 4.31. A. PHEMA ve B. PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel gruplarında BeWo, C. PHEMA ve D. PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel gruplarına ise 3:1 ortak kültür grubunun 2. 4. ve 7. gün Vortiksetin uygulaması sonrası MMP-9 protein seviyelerinin ölçümü.

a; Kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ($p \leq 0,05$), b; 30 μ M Vortiksetin doz grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ($p \leq 0,05$), c; 60 μ M Vortiksetin doz grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ($p \leq 0,05$).

4.9. SEM Görüntüleri

Hazırlanan kriyojellerin, yüzey yapılarını, gözenek boyutlarını ve dağılımlarını incelemek amacıyla karakterizasyon çalışması dahilinde taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntüleri alınmıştır. Hücre ekimi yapılan kriyojellerin ise hücre dağılımlarını, gözeneklere tutunmalarını ve büyümelerini inceleyebilmek için SEM görüntüleri alınmıştır. Hücre ekimi yapılmamış (hücresiz) ve hücre ekimi yapılmış (hücreli) kriyojel grupları bir arada verilerek karşılaştırmaları yapılmıştır.

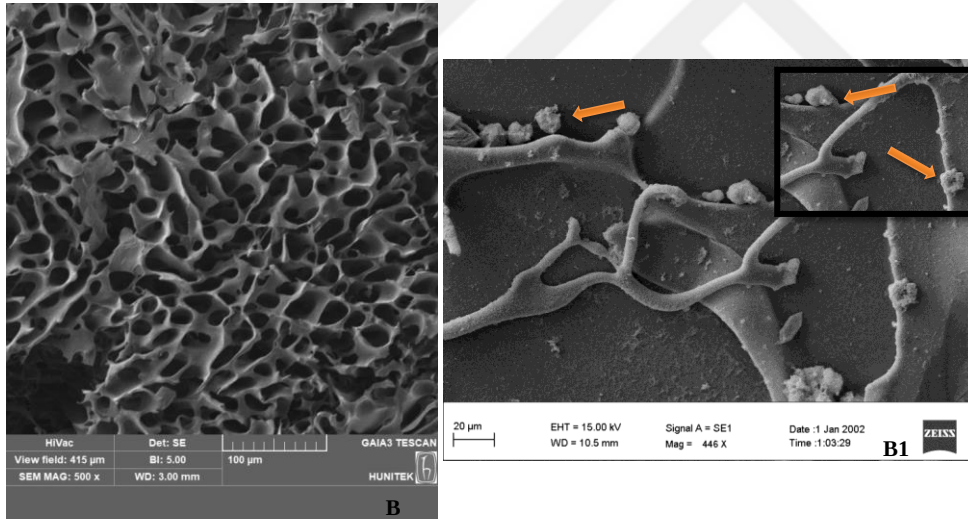
PHEMA kriyojelin hücresiz ve hücreli SEM görüntüleri Şekil 4.32’de verilmiştir. Hücresiz PHEMA kriyojel incelendiğinde gözenek duvarlarından ve yüzey yapısından anlaşıldığı üzere kriyojelin sentezi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Hücreli PHEMA kriyojelde ise 3:1 (BeWo ve HUVEC) hücre oranının bir araya gelerek hücre kümeleri oluşturduğu ve PHEMA kriyojelin gözeneklerine, gözenek duvarlarına başarılı bir şekilde tutunduğu görülmüştür. PHEMA kriyojellerin polimerizasyonunda yer alan PEDGA’nın biyouyumlu olmasından dolayı hücre tutunmasını kolaylaştırdığı bilinmektedir [39].



Şekil 4.32. PHEMA kriyojelin A. hücresiz ve A1. hücreli 7 gün için SEM görüntüleri; A) 500 X, bar 100 µm, A1) 282 X, bar 20µm (→ 3:1 (BeWo:HUVEC) ortak kültür hücreleri).

PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojelin hücreli ve hücreli SEM görüntüleri Şekil 4.33’de verilmiştir. Hücreli PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel incelendiğinde gözenek boyutlarının birbirleriyle bağlantılı ve iyi olduğu görülmektedir. Gözeneklerin dağılımından ve yüzey yapısından anlaşıldığı üzere kriyojelin sentezi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. MTT canlılık analizinin en yüksek hücre canlılığını veren PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojelin hücreli görüntüleri incelendiğinde 3:1 oranının hücre kümeleri oluşturarak yüzeye tutundukları görülmektedir. PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel iskelesinde PHEMA kriyojele göre daha fazla hücre kümeleri olduğu görülmektedir.

Yapılan analizler sonucunda, plasental bariyer modeli için doku iskelesi olarak KOL Tip IV ve FA ile fonksiyon kazandırılan PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojelin en uygun bileşenlere ve özelliklere sahip olduğu görülmüştür.



Şekil 4.33. PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojelin B. hücreli ve B1. hücreli 7 gün için SEM görüntüleri; B) 500 X, bar 100 µm, B1) 446 X, bar 20µm (→ 3:1 (3 BeWo, 1 HUVEC) ortak kültür hücreleri).

5. TARTIŞMA

Gebeliğin başlamasıyla birlikte kadınlarda fiziksel ve ruhsal olarak değişimler meydana gelmektedir. Fertilizasyon ile birlikte embriyo endometriyuma tutunarak fetal ve plasental gelişimin başlangıcını oluşturmaktadır. Gebelik boyunca anne ile bebek arasındaki bağlantıyı ve alışverişi sağlayan plasenta dokusunun seçici geçirgen bir bariyer görevi bulunmaktadır. Plasenta, temel olarak alınması gereken (folik asit, laktat, vitamin, mineral, su) besinlerin, oksijenin geçişini, fetüsten oluşan atık maddelerin uzaklaştırılmasını sağlayan, gebeliğin devamlılığı için önemli olan hormonların salgılanmasını gerçekleştiren çok yönlü bir dokudur. Plasentadan pasif difüzyon veya taşıyıcı proteinler aracılığıyla besin maddelerinin geçmesiyle birlikte ilaçlar da geçmektedir. Antibiyotikler ve antidepresanlar hamilelikte kullanımı fazla olan ilaçlardır. Hamilelik ile birlikte kadınlarda meydana gelen fiziksel, sosyal ve ruhsal değişimler kadınları depresyona sürükleyebilmektedir. Gebelikte ilaç kullanımının güvenliği hakkında net veriler olmamasına rağmen hamilelik bilinmeden önce veya hamilelik ile birlikte ortaya çıkan depresyon gibi ruhsal bozukluk durumunun düzeltilmesi için antidepresanlar reçete edilmektedir [125]. Selektif serotonin geri alım inhibitörlerinin (SSRI) diğer antidepresanlara kıyasla daha güvenli ve etkili olduğu düşünüldüğü için hamilelikte reçete edilmesi gereken antidepresanlar olarak kabul edilmektedir [126]. Plasenta bariyerinden geçtiği bilinen bu antidepresanların fetüs üzerindeki etkileri merak konusu olmaktadır. Ancak insan gebelerin plasenta dokusu üzerinde etik kısıtlamalardan dolayı çalışmalar yapılamamaktadır. Gebe hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar, insan ile hayvanlar arasındaki farklılıklardan dolayı kullanılan ilaçların etkinliklerini karşılaştırmada kesin sonuçlar vermemektedir. Hayvanlarda (fare ve sıçan) yapılan talidomid ilaç testinin negatif olduğu ancak insanlarda teratojenik etki yarattığı ya da hayvanlarda teratojenik olan diflunisalin insanlarda olmadığı örnekler bulunmaktadır [127, 128]. İnsanlar ve hayvanlar arasında moleküler düzeyde gen ve protein ifadelerinde farklılıklar olması translasyonel mekanizmaların karşılaştırmalarını sınırlamaktadır [14]. Gebelikte kullanılan ilaçların fetal gelişime olan zararını en aza indirebilmek amacıyla araştırmalar yapılmaktadır. İnsan plasenta bariyerinin daha iyi anlaşılabilmesi için alternatif yaklaşımlar geliştirilmektedir. *İn vitro* çalışmalar ilaçların ve kimyasalların hücresel veya dokudaki etkilerini değerlendirme son yıllarda sıklıkla tercih edilmektedir. Plasenta dokusu karmaşık ve çok katmanlı bir yapıya sahiptir [13]. *İn vitro* koşullarda 2B ve 3B hücre

kültür çalışmaları uygulama alanına uygun olacak şekilde tercih edilmektedir. 3B hücre kültürleri 2B kültüre göre *in vivo* ortamı daha iyi taklit edebilmesi sayesinde araştırmalarda sıklıkla tercih edilmektedir. Kök hücre araştırmaları ve farklılaşmaları, ilaç keşfi ve farmakolojik uygulamaları, kanser biyolojisi ve tümör modellemeleri, gen ve protein ekspresyonları, hücre biyolojisini ve fizyolojisini anlamaya yönelik hücre proliferasyon ve hücre döngüsü, hücre iskeleti, apoptoz, mikroçevre oluşturma, ortak kültür ve toksisite çalışmalarında 3B hücre kültürleri uygulanmaktadır [33]. 3B hücre kültürleri, hücrelerin bulundukları dokulara özgü olan mikro çevrelerini oluşturabilecekleri bir ortam sağlamaktadır. Placenta dokusunun *in vivo*yu en iyi şekilde yansıtabilmesi için 3B ortamda modellemeleri yapılmaktadır. Günümüzde placenta bariyerinin modellenmesi kimyasal maddelerin, ilaçların, xenobiyotiklerin fetüse geçişini belirlemeye yönelik aktif bir araştırma alanı olmuştur [14]. Placental trofoblast biyolojisinde hücre-hücre ve hücre-HDM etkileşimleri yeterince iyi anlaşılamamıştır. Bu tez çalışmasında oluşturulan placenta modeliyle kriyojel sistem üzerinde BeWo ve HUVEC ortak hücre kültürlerinin kullanıldığı benzer bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu çalışma kapsamında, HDM'yi temsilen fibronektin, folik asit ve kolajen içeren kriyojeller sentezlenmiş ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Hücre proliferasyonunu en iyi destekleyen kriyojel kalınlığı seçilerek hücresel çalışmalara geçilmiş, BeWo ve HUVEC hücrelerinin ortak kültürü yapılarak placental bariyer modeli oluşturmadaki katkıları canlılık analizi, hormon ve enzim seviyeleri ölçülerek değerlendirilmiştir.

Tez kapsamında hazırlanan PHEMA kriyojellerin birbirleriyle bağlantılı makro veya süper makro gözeneklerden oluşmaları diğer jellere göre kullanımını avantajlı kılmaktadır. PHEMA kriyojellerin mekanik olarak sağlam olmaları, geniş ve bağlantılı gözeneklere sahip olmaları sayesinde oksijen geçirgenliğini sağlamaları ve hidrofilik özellikte olmaları yapılarında canlı dokular gibi yüksek miktarda su bulundurmalarını sağlamaktadır [129]. Bu olumlu özelliklerine rağmen PHEMA temelli kriyojelleri hücrelerin tutunabileceği daha uygun bir yüzey haline getirebilmek ve *in vivo* placenta dokusunu yansıtabilmek için polimerizasyon aşamasında placenta HDM bileşenleri olan FN, KOL Tip IV ve jelatin yapıya katılmıştır. Erken embriyonik damarların etrafında ifade edildiği bilinen FN embriyogenez, doku onarımı, hücre yapışması ve göç süreçlerinde yer almaktadır ve yapıya katılmıştır [24, 74]. KOL Tip IV'ün trofoblast hücreleri tarafından salgılanarak embriyonik ve placental gelişime katkı sağladığı

bilinmektedir [5]. Kolajenden üretilen jelatin ise iskele yapısına katılarak hücrelerin tutunmasını, büyümesini ve göçünü arttırması sağlanmaktadır [60]. Çalışmamız kapsamında bu 3 HDM bileşeni kriyojel yapısına katılarak PHEMA kriyojele fonksiyonellik kazandırılmıştır. Böylece farklı içeriklere sahip kriyojel grupları sentezlenmiştir. Bu kriyojeller PHEMA, PHEMA+KOL Tip IV, PHEMAGEL ve PHEMAGEL+FN olarak isimlendirilmiştir. PHEMA kriyojelin yapısına HDM bileşenlerinin eklenerek fonksiyonellik kazandırılması polimerizasyon aşamasında yapıldığı için ayrı ligand bağlama basamakları gerçekleştirilmemiş ve toksik kimyasalların kullanılması gerekmemiştir [39].

Hazırlanan kriyojellerin karakterizasyon analizleri için şişme testleri, mikro-CT, FTIR ve SEM analizleri yapılmıştır. PHEMA temelli kriyojellerin sentezlenmesinde kullanılan monomer HEMA ve çapraz bağlayıcısı PEGDA'nın toksik olmaması ve hidrofilik özellikte olması PHEMA, PHEMA+KOL Tip IV, PHEMAGEL ve PHEMAGEL+FN kriyojellerin şişme oranlarının (% 86-83) yüksek olmasını sağlamaktadır. PHEMA temelli kriyojelin şişme oranı yapılan bir çalışmadaki oranlara benzer sonuçlar vermiştir [39]. PHEMA+KOL Tip IV kriyojel ise en yüksek PHEMAGEL kriyojel ise diğer jellere kıyasla daha düşük şişme derecesi göstermiştir. Bu durum jelatinin şişme özellikleri üzerindeki etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Makrogözeneklilik derecesi PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV kriyojelde % 80 iken PHEMAGEL ve PHEMAGEL+FN kriyojellerde % 70'e düşmüştür. PHEMA+KOL Tip IV kriyojelin yüksek makrogözeneklilik derecesi canlılık analizleriyle orantılı sonuçlar vermiştir. Gözenek boyutunun hücrelerin tutunabilmesi, çoğalabilmesi ve oksijen alışverişinin sağlanabilmesi geniş yapıda olmasını gerekmektedir. Polimerleşme sıcaklığı, süresi, kullanılan çözücü madde ve çapraz bağlayıcılar gözenek boyutunu etkileyen faktörlerdir. Jelatinin çapraz bağlayıcı olarak kullanılan glutraldehitin polimer çözelti içerisindeki serbest amin gruplarına bağlanması gözenek boyutunun oluşmasında etkilidir.

PHEMA temelli kriyojelin yapısına fonksiyon kazandırmak amacıyla doğal HDM elemanları jelatin, KOL Tip IV ve FN polimerizasyon aşamasında çözeltiye eklenmiştir. PHEMA, PHEMA+KOL Tip IV, PHEMAGEL ve PHEMAGEL+FN kriyojellerinin FTIR analizi ile HDM elemanlarının yapıya katılıp katılmadığı değerlendirilmiştir. FTIR sonuçları KOL Tip IV'ün PHEMA+KOL Tip IV yapısına, jelatinin yapısına ve

FN'nin PHEMAGEL+FN kriyojelin yapısına başarılı bir şekilde katıldığını göstermiştir [43, 122, 124].

Gözenek boyutlarının mikro-CT analiz sonuçları literatür bilgilerini desteklemektedir [130]. PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV kriyojellerin gözenek boyutlarını ve yüzey özelliklerini görebilmek amacıyla SEM görüntülemesi yapılmıştır. Görüntüler mikro-CT ile sonuçlarını destekler nitelikte olup gözenek boyutunun ve dağılımının başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermiştir.

PHEMA, PHEMA+KOL Tip IV, PHEMAGEL ve PHEMAGEL+FN kriyojel disklerine hamilelikte alınması gerekli bir vitamin olan folik asitin bağlanması başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Bağlanma sonrası folik asitin *in vitro* salım analizi yapılmıştır. 4, 10, 24 ve 48.saatlerde folik asitin *in vitro* salımında artan inkübasyon süreleri için tüm kriyojel gruplarının belirli bir seviyede (% 20-25) olduğu gözlenmiştir. Kriyojel gruplarının 48.saatteki folik asit salımında azalma olduğu (% 20) görülmüştür. Yapılan bir çalışmada, FA'nın PHEMA üzerinden ilaç salma yöntemine ilişkin PHEMA hidrojele FA bağlanmış ve FAHEMA hidrojeller elde edilmiştir. FA'nın 10 ve 24 saat boyunca farklı pH ortamlarındaki salımı incelenmiştir. pH 1, 3, 5 ve 7'de bakılan FA salımları pH 1 ve 3'te en az kümülatif salımı vermiştir [131]. Folik asitin pH, sıcaklık, ışık, asidik veya alkali maddeler tarafından bozulmaya duyarlı olduğu bilinmektedir. Başka bir çalışmada ise bakır-aljinat hidrojellere folik asit bağlanmıştır. Folik asit-bakır aljinat hidrojellerindeki folik asit salımının anlaşılması için 2 saat boyunca farklı pH değerlerine maruz bırakılmışlardır. 10 dakikada bir örnek alınarak salımları incelenmiştir. Salım sonuçları folik asidin pH 8.2 ve pH 5.4'te kademeli olarak artan bir salım profili gösterdiğini, pH 1.2' de ise belirgin bir salımın görülmeyeceği sonucuna varılmıştır. Bu durum folik asidin bazik ortamlarda asidik ortama göre daha hızlı bir salım gösterdiğini vurgulamıştır [132]. Folik asit pek çok besin maddesinde bulunabilen bir vitamindir. Yetersiz beslenme durumları dikkate alınarak takviye edici bir tablet olarak alınması önerilmektedir. Folik asit özellikle hamilelik sürecinde fetal gelişim üzerinde önemli etkilere sahiptir. Gebelik ile başlayan plasenta ve fetal gelişim için hızlı hücre bölünmesi ve büyümesinde rol almaktadırlar. Bundan dolayı hamile kadınlar besin maddelerine ek olarak folik asiti takviye olarak da almaktadırlar. Eksikliği fetal gelişim üzerinde ciddi sorunlara yol açabilmektedir. Tez çalışmasında folik asitin önemi göz önünde bulundurularak farklı içerikler ile hazırlanmış olan kriyojel gruplarına takviye olacağı düşünülerek bağlanmıştır. Hazırlanan kriyojel grupları arasından uygun

içeriğe sahip olan kriyojel doku iskelesinin plasental bariyer modeli olarak seçilmesi amaçlanmıştır.

Karakterizasyon çalışmaları sonucunda farklı içeriklerle hazırlanmış olan PHEMA temelli kriyojellerin gruplarının gözenek boyutları, dağılımları ve kimyasal yapı özellikleri değerlendirilmiş ve *in vitro* hücre kültür çalışmaları için uygun bulunmuştur. 3B hücre kültür ortamında farklı içerikler ile hazırlanmış kriyojel doku iskeleleri kullanılarak yeni nesil plasental modeller oluşturulmuştur. Placenta dokusunu temsil etmesi için seçilen BeWo ve HUVEC hücreleri kriyojel gruplarına ekilerek kriyojellerin hücreler üzerindeki biyouyumlulukları ve hazırlanan kriyojel grupları arasından en iyi hücre canlılığını veren grupların doku iskelesi olarak kullanılabilirlikleri değerlendirilmiştir. HUVEC hücresi ile yapılan 3B ortak kültür çalışmalarında inkübasyon süresinin 7 gün boyunca sürdürüldüğü ve artan inkübasyon süresine bağlı olarak hücre canlılığında artış olduğu görülmüştür. [133]. Başka bir çalışmada zika virüsüne maruz bırakılan BeWo ve HUVEC hücreleri hidrojel üzerine ekilmiştir. Placenta hücrelerinin viral maruziyetlerini anlayabilmek için plasental model tasarlamışlardır. İlk olarak BeWo hücresi ekilerek 7 gün boyunca ortamda çoğalması sağlandıktan sonra HUVEC hücresi ekilmiştir ve model üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir [134]. BeWo ve HUVEC hücrelerinin ortak kültür oranlarının belirlenmesi için hem 2B hem de 3B kültür (sferoid içerisinde iskelesiz ortamda) ortamında yapılan bir başka çalışmada 2:1, 3:1 ve 4:1 (BeWo-HUVEC) hücre konsantrasyonları 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edilmiştir ve sonrasında canlılık analizleri yapılmıştır. BeWo ve HUVEC hücrelerinin ikilenme zamanları birbirinden farklıdır. HUVEC hücresi BeWo hücresine göre daha erken log fazına ulaşmaktadır. İkilenme zamanlarındaki bu farklılıktan dolayı hücre oranlarına karar verilmiş ve HUVEC hücresi BeWo hücresine göre daha az oranda ortama eklenmiştir. 3:1 hücre oranının hem 2B hem de 3B kültüründe hücre canlılığının diğer grupla kıyasla daha yüksek çıktığı görülmüştür [18]. Bu çalışmada kriyojel doku iskelesi üzerinde BeWo ve HUVEC hücrelerinin canlılıkları 7 gün boyunca takip edilerek ilk kez değerlendirilmiştir. HDM bileşenleri ile zenginleştirilen 8 farklı kriyojel grubuna hücre ekimi yapıldıktan sonra 2, 4 ve 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır ve % hücre canlılıkları hesaplanmıştır. Kriyojel grupları birbirleri ile karşılaştırılarak hücre canlılığın artış gösterdiği plasental bariyer modelleri incelenmiştir.

BeWo hücrelerinin mono kültür canlılık sonuçları değerlendirildiğinde 7.gün hücre canlılığı jelatin içermeyen PHEMA kriyojeller ve özellikle PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel grubunda hücre canlılığı diğer jellere göre en yüksek yüzdeyi vermiştir. Kriyojel gruplarına ekilen HUVEC hücrelerinin sonuçlarında ise PHEMA+KOL Tip IV+FA ve jelatin içeren kriyojel grupları 7.günde en yüksek hücre canlılıklarını vermiştir. PHEMA+KOL Tip IV+FA ve PHEMAGEL+FN+FA gruplarının hücre canlılıkları % 160'a yükselmiştir. Plasenta dokusunun daha iyi yansıtılabilmesi için BeWo ve HUVEC hücrelerinin bir arada kullanıldığı 3:1 ortak kültürü yapılan kriyojeller gruplarındaki hücre canlılıkları PHEMA+KOL Tip IV+FA, PHEMAGEL ve PHEMAGEL+FN+FA gruplarında özellikle 7.günde en yüksek canlılıkları vermektedir. Bu sonuçlar hücre tutunmasında, çoğalmasında ve oksijen taşınmasında önemli bir parametre olan gözenek boyutunun en yüksek derecesini veren PHEMA+KOL Tip IV grubumuzla orantılı sonuçlar göstermektedir. PHEMA'nın sentezlenmesinde kullanılan monomer HEMA'nın PEGDA ile çapraz bağlanmasıyla hazırlanan kriyojel yüzeyinin hücre tutunmasını arttırdığı literatürde verilmiştir [135]. 3B kriyojel ortak kültür sistemleriyle oluşturulan plasental bariyer modellerinin sonuçları değerlendirildiğinde HDM yapısının dinamik olduğu bilinmektedir; proteinlerden, proteoglikanlardan ve glikoproteinlerden oluşmaktadır ve bu bileşim doku tipleri arasında farklılık gösterebilmektedir. Yapılan bir çalışmada HDM bileşenlerini içeren metakrilatlı jelatin (Me-Gel) ve metakrilatlı hyaluronik asit (Me-HA) kriyojeller üretilmiştir. İnsan adipoz doku kökenli mezenkimal stromal hücreleri (HADMSC) kriyojellere ekilmiştir ve jellerin adipojenik farklılaşmayı desteklediği görülmüştür. İnsan beyaz adiposit progenitor hücreleri (HWA) ise aynı kriyojellere ekilmiştir ve adipojenik farklılaşmasından sonra HUVEC hücreleri ekilmiştir. 7 gün boyunca kriyojelde ortak kültürü yapılan hücrelerin adipojenik gen ifadelerini arttırdığı görülmüştür. Ayrıca HUVEC hücrelerinin kılcal damar benzeri yapılar oluşturduğu gözlenmiştir [136]. Kriyojel iskelelerine eklenen HDM bileşenlerinin doğal ortamı yansıtması sayesinde hücreler özelliklerini koruyarak çoğalma göstermektedirler. Kolajenler, fibronektin, elastin ve büyüme faktörleri HDM yapısının büyük ölçüde bileşenlerini oluşturmaktadır. Başka bir çalışmada HEMA ile sentezlenen kriyojellere HDM bileşenleri olarak hyaluronik asit ve jelatin eklenmiştir. HA ve jelatin yapıdaki kriyojel üzerinde fare miyoblast hücre hatları (C2C12) inkübe ekilmiştir ve 5.günün sonunda hücre canlılığında 2B ortama kıyasla yüksek düzeyde artış olduğu gözlenmiştir [133]. Bu tez çalışmasında, HDM yapısını yansıtması için seçilen kriyojel doku iskelesine

jelatin, kolajen tip IV veya fibronektin ve folik asit ile fonksiyon kazandırılarak *in vivo* en iyi şekilde yansıtabilecek plasental bariyer modelleri oluşturulmuştur. Jelatin biyoaktif sekans olarak bilinen RGD (Arjinin-Glisin-Aspartik asit) dizisini içermektedir ve sekansın hücrelerin tutunmasını ve çoğalmasını arttırdığı yapılan çalışmalarla bilinmektedir [39]. Yapılan bir çalışmada jelatin ile fonksiyon kazandırılan kriyojel disklere insan kemik iliği stromal hücreleri ekilmiş ve 6 hafta boyunca inkübe edilmiştir. HDM elemanı olan jelatin ile kriyojellerin modifiye edilmesi hücrelerin çoğalmasını arttırmış ve farklılaşmasına destek olarak hücrelerin kendi mikro çevresini oluşturan HDM elemanlarının sentezini arttırmıştır [137]. Fibronektin hücre dışı formu hücre dağılması, büyümesi, göçü ve kasılması için önemli bir başlatıcıdır. FN hücre dışı maddenin işlevselleşmesini sağlamakta, doku tamir ve rejenerasyonunu yönetmektedir [75]. Yapılan başka bir çalışmada hidrojel iskelesine anjiyogenez sürecinde önemli rolleri olan hyaluronik asit ve fibronektin HDM bileşenleri olarak eklenmiştir. GMHA ve GMHA/FN hidrojellerine HUVEC hücresi ekilerek 6 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu süreçte FN'nin farklı konsantrasyonlarında hücre proliferasyonunda, göç ve anjiyojenik fenotipinde değişimler gözlenmiştir. GMHA hidrojeller de HUVEC canlılığı desteklenmemiştir. GMHA/FN hidrojeller ise artan FN konsantrasyonlarına (125, 250 ve 500 µg ml⁻¹) bağlı olarak HUVEC hücrelerinin uzantıları ile tübül benzeri ağsı yapılar oluşturdıkları rapor edilmiştir [138]. FN'nin HUVEC hücreleri üzerinde anjiyogenezi teşvik etme potansiyeli incelenmiştir. İnsan plasenta tip IV kolajen, implantasyonda trofoblast hücrelerinin endometriumda nüfuzunu devam ettirmesinde önemli katkı sağlamaktadır. Poliakrilamid hidrojeller üzerine yapılan bir çalışmada plasenta dokusunda bol bulunan HDM elemanı olan kolajen tip I ile hidrojeller işlevselleştirilmiştir. Daha sonra bu jellerin üzerine BeWo hücresi ekilmiş ve hücrelerin küçük veya tek koloniler yaparak büyüdüğü gözlenmiştir [139]. Dokunun yapısal bütünlüğünü sağlayan HDM bileşenlerinden kolajenin bariyere eklenmesi *in vivo* yapıya benzerlik açısından anlam taşımaktadır [5]. Folik asit ise, DNA replikasyonu için gerekli olan, aminoasit sentezinde ve vitamin metabolizmasında yer alan bir dizi enzimatik reaksiyon için substrat olarak gerekli olan temel bir besindir [67]. İnsanlarda folik asit plasentadan aktif taşınım ile fetüse aktarılmaktadır [140]. HDM bileşenlerinin bu önemli özellikleri göz önüne alındığında kriyojel doku iskelesi ile oluşturulan modellerin önemi artmaktadır. Kriyojellerin biyouyumluluğunu anlayabilmek için yapılan MTT analizi sonucunda hücrelerin çeşitli özellikler ile sentezlenen kriyojellere uyumlu olduğu, jellerin hücreler üzerinde toksik bir etki

yaratmadığı ve hücrelerin canlılıklarını 7.güne kadar koruyarak doku iskelesi içerisinde çoğalıp sayılarını arttırdıkları gözlenmiştir. Analiz sonuçları değerlendirildiğinde PHEMA+KOL Tip IV+FA, PHEMAGEL ve PHEMAGEL+FN+FA kriyojel grupları ile hazırlanan plasental modellerin inkübasyon sürelerine bağlı olarak doğrusal artışlar göstermesi hücrelerin canlılıklarını koruduğunu ve arttırdığını göstermektedir.

PHEMA, PHEMA+KOL Tip IV+FA, PHEMAGEL ve PHEMAGEL+FN+FA kriyojel gruplarının mono ve 3:1 ortak kültürdeki Vortiooksetin uygulamasının hücre canlılığına olan etkileri incelenmiştir. BeWo hücresinin mono kültüründeki dozları ve kriyojel grupları incelendiğinde 30 μ M ve 60 μ M doz grupları arasında anlamlı bir farkın görülmediği ancak kontrol grubuna göre özellikle PHEMA kriyojelde anlamlı azalmalar görülmüştür. Hücre canlılığı % 80'e kadar düşmüştür. HUVEC hücresinin mono kültürüne uygulanan aynı dozlar hücre canlılığını % 60 seviyelerine düşürmüştür. Tüm kriyojel grupları incelendiğinde 30 μ M ve 60 μ M doz gruplarının 7.gününde anlamlı azalmalar olduğu anlaşılmıştır. Yapılan bir çalışmada SSRI ilaçlarından olan fluoksetin ve sertralinin farklı dozları HUVEC hücrelerinin canlılığı üzerinde BeWo hücrelerine kıyasla daha büyük bir etki yarattığı rapor edilmiştir [141]. Tez çalışmasında kullanılan SSRI grubundan Vortiooksetinin HUVEC hücrelerinin canlılıklarını BeWo hücrelerine kıyasla daha fazla düşürdüğü benzer şekilde görülmüştür. Bu durum endotelial hücre yapışmasının trofoblast hücre yapışmasına göre SSRI grubu ilaçlarından daha fazla etkilendiğini düşündürmektedir [141]. 3:1 grubunun dozları ve kriyojel grupları karşılaştırıldığında PHEMA+KOL Tip IV+FA grubuna uygulanan dozların canlılık üzerine anlamlı bir etkisi görülmemiştir. Diğer gruplar kontrol grubuna göre azalma göstermiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda ortak kültüre edilen kriyojel gruplarında plaseenta dokusuna daha yakın olmalarından dolayı mono kültürlerle kıyasla hücrelerin uygulanan ilacın toksisitesine daha dirençli oldukları görülmüştür. BeWo ve HUVEC hücrelerinin Vortiooksetin maddesine verdikleri yanıtları anlayabilmek için yapılan bir çalışmada Vortiooksetin uyguladıktan sonra 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakılan hücrelerin IC₅₀ konsantrasyonları hesaplanmıştır. BeWo hücresi 72.saatte 26,3 μ M, HUVEC hücresi ise 14 μ M konsantrasyonlar vermiştir [18]. Bu tez kapsamında kriyojele ekilen hücelere uygulanacak doz konsantrasyonları değerlendirilirken diğer çalışmada bulunan IC₅₀ konsantrasyonları ve hücrelerin ekileceği ortamın 3B kriyojel iskeleler olduğu göz önünde bulundurulmuştur. Kriyojel modellerindeki hücre canlılık analizleri değerlendirildiğinde ilaç doz belirleme çalışmalarında ortak kültür ile daha

yüksek dozlarda deneyler yapılabilir. Ayrıca toksisitesinin olduğu bilinen veya şüphe edilen ksenobiyotik ve kimyasal maddelerin 3B hücre kültür deneyleri yapılarak olası yan etkilerinin anlaşılması sağlanabilir.

Tez kapsamında kullanılan BeWo hücresinin mono kültürü ve 3:1 hücre oranı ile ortak kültüründeki β -hCG hormonu üretimi hücre canlılığın en yüksek olduğu PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojelde ve kontrolü PHEMA'da incelenmiştir. BeWo hücresinin mono kültüründe PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojelindeki β -hCG hormon miktarının en yüksek miktarda salgılandığı görülmüştür. Bu sonuç hücre canlılık analiziyle orantılıdır. BeWo hücrelerinin HUVEC'ler ile ortak kültüründe β -hCG hormonu salgılanmaya devam etmiştir. Yapılan bir çalışmada hidrojel (GelMA) biyomalzemesi kullanılarak BeWo ve HUVEC hücrelerinin olduğu plasenta modeli tasarlanmıştır. GelMA üzerine sadece BeWo ekilmiştir ve daha sonra HUVEC eklenerek model oluşturulmuştur. GelMA'daki BeWo hücresinin hCG salgıları tam modele kıyasla daha yüksek bulunmuştur [134]. Bu tez çalışmasında BeWo hücrelerinin mono kültüründe ortak kültüre kıyasla hCG seviyeleri HDM elemanlarının eklendiği kriyojel grubunda (PHEMA+KOL Tip IV+FA) daha yüksek bulunmuştur. Hücre salgılarındaki bu değişikliklerin ortak kültürden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Trofoblast hücreleri aracılığıyla salgılanan β -hCG hormonun kullanılan antidepresanlar ile azalması veya engellenmesi hamileliğin başlangıcı önemli olan trofoblast hücrelerinin endometriyuma yerleşmesini ve farklılaşmasını olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Erken doğum, preeklampsi, fetal gelişimde gerileme gibi sonuçlara neden olabilmektedir [106].

MMP-2 ve MMP-9 protein seviyeleri PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel gruplarında incelenmiştir. MMP-2 ve MMP-9 seviyeleri mono ve ortak kültür ile kriyojel grupları arasında düşük seviyede ifade edilmekte ve enzim aktiviteleri açısından gruplar arasında büyük farklılıklar göstermemiştir. Yapılan bir çalışmada ilk trimester hücre dizisi olan HTR8/SVneo ve HUVEC hücrelerinin ortak kültüründeki hücre istilasını belirteçleri olan MMP-2 ve MMP-9 seviyeleri sonuçlarımıza benzer şekilde düşük oranda ifadesi görülmüştür [142]. Başka bir çalışmada ise ilk trimesterlere göre sonraki trimesterlerde BeWo hücrelerinin MMP-2 ve MMP-9'u ihmal edilebilir miktarlarda ifade ettiği bildirilmiştir [143]. MMP-2 ve MMP-9 proteinleri hamileliğin başlangıcında trofoblast hücrelerin endometriyuma istilasında destek olmaktadır. Bazal membranın ve hücre dışı bileşenlerin parçalanmasını sağlayarak

hücrelerin endometriyuma yerleşmelerine ve implantasyonun başarılı bir şekilde gerçekleşmesine katkı sağlamaktadırlar. Plasentasyon, endometriyumun yeniden düzenlenmesi ve onarılması, menstrüasyon döngüsü, embriyo gelişimi, uterus büyümesi, trofoblast hücrelerinin farklılaşması gibi çeşitli görevlerde yer almaktadırlar. Ancak bu proteinlerin aşırı ifadesi fetal ve bazal membranlarının HDM yapısının bozulmasına sebep olabilmektedir. İnhibitörler aracılığı ile trofoblast istilasını sınırlandırılarak HDM parçalanması dengede tutulabilmektedirler. Hamileliğin başlangıcında ve devamında önemli olan bu proteinler ile ilgili güncel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır [112, 113].

3:1 hücre ekimi yapılan PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojellerin 7.gün SEM görüntüleri incelendiğinde KOL Tip IV ve FA ile etkinliği arttırılan kriyojelde hücrelerin başarılı bir şekilde tutunduğu ve bir araya gelerek küremsi bir şekil oluşturduğu görülmüştür. Bir çalışmada kriyojel doku iskelesi üzerine ekilen lenfosit hücreleri ekilmiştir ve SEM ile görüntülenmiştir. Hücrelerin kriyojel yüzeyinde bağlı oldukları morfolojik şekiller benzer sonuçlar vermiştir [35]. Kriyojellerin polimerizasyonunda kullanılan PEDGA'nın biyouyumlu olması hücre tutunmasını kolaylaştırmıştır [39]. Hücre canlılığının en yüksek olduğu PHEMA+KOL Tip IV+FA grubunun SEM görüntüleri ile canlılık sonuçları uyumlu bulunmuştur. Kriyojeller, hücrelerin bir arada birbirleriyle bağlantı kurmasını, HDM bileşenlerini sentezleyebilmelerini sağlayan ve hücrelere mekanik olarak destek veren doku iskeleleridir. Birbirleriyle bağlantılı olan gözenekler hücrelerin tutunması, göçünü, besinlerin geçişini ve oksijen alışverişini sağlamaktadır [72].

Tez çalışmasında, SSRI antidepresan sınıfından olan Vortioksetinin farklı içerikler ile hazırlanmış olan kriyojel doku iskelelerinden oluşturulan plasental bariyer modelleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiş ve canlılık analizleri sonucunda PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel en uygun plasental model olarak değerlendirilmiştir. 3B plasental kriyojel ortak kültür sistemi ile toksisite, hormon salgılanması ve enzim aktivitesine ait değerlendirmeler tez kapsamında sunulmuştur. Oluşturulan plasental model ile gebelikte kullanımı zorunlu olan ilaçların (antibiyotik, antidepresan, antikanser), yeni geliştirilen ve etkinliği bilinmeyen ilaçların veya gıda katkı maddelerinin, kimyasal maddelerin ve ksenobiyotiklerin plasenta bariyerinden geçişi hakkında araştırmaların yapılabileceği düşünülmektedir. Tez çalışmasının devamında oluşturulan 3B kriyojel sistemine plasenta dokusundaki karmaşık doku ortamının daha iyi yansıtabilmesi için heterojen

hücresel mikro ortamın dahil edilmesi, daha kapsamlı bir şekilde hormon analizlerinin gerçekleştirilmesi ve moleküler düzeyde hücrelerin toksisiteye verdiği yanıtların mekanizmasının incelenmesi planlanmaktadır.



6. YORUM

1. PHEMA kriyojellerin yapısına plasenta dokusunun HDM elemanları jelatin, KOL Tip IV ve FN katılmıştır ve karakterizasyon analizleri yapılarak uygunlukları değerlendirilmiştir. PHEMA+KOL Tip IV kriyojel grubu en yüksek makrogözeneklilik derecesini vermiştir. Gözenek boyutu hücrelerin çoğalması ve gaz alışverişi için önem taşımaktadır.

2. Jelatin, KOL Tip IV ve FN'nin kriyojellerin yapısına katıldığı FTIR analizi ile değerlendirilmiştir ve HDM elemanlarının PHEMA kriyojelin yapısına başarılı bir şekilde katıldıkları gözlenmiştir. PHEMA'nın biyouyumlu olması ve toksik olmaması çalışmalarda kullanılmasını avantajlı kılmaktadır.

3. Hazırlanan kriyojellere hamilelikte belirli konsantrasyonun üzerinde alınması gereken folik asit bağlanmıştır ve *in vitro* koşullardaki salım miktarları değerlendirilmiştir. Folik asit salımı inkübasyon süresine bağlı olarak azalma göstermiştir. Bu durum jellerin folik asit ile başarılı bir şekilde bağlandığını göstermiştir.

4. Sentezlenen 8 farklı kriyojel gruplarına BeWo ve HUVEC hücrelerinin mono ve 3:1 (BeWo-HUVEC) oranında ortak kültürü yapılmıştır. Kriyojellerin biyouyumlukları değerlendirildiğinde mono ve ortak kültür gruplarında en yüksek hücre canlılığını veren kriyojelin PHEMA+KOL Tip IV+FA olduğu anlaşılmıştır. En yüksek gözenek boyutunu veren bu kriyojel grubunun hücrelerin tutunmasını ve çoğalmasını arttırdığı yapılan hücre canlılık analizleri ile gösterilmiştir. Yapıya katılan HDM elemanlarının da hücre canlılığını arttırdığı görülmüştür.

5. Farklı özellikler ile hazırlanmış olan 3B kriyojel gruplarına Vortiksetin maddesini uygulanmıştır ve verdiği yanıtlar incelendiğinde HUVEC hücrelerinin BeWo hücrelerine kıyasla hücre canlılıklarında 30 μ M ve 60 μ M dozlarda azalma göstermiştir. Ortak kültür grubunda bir araya getirilen hücreler Vortiksetin maddesine karşı anlamlı azalmalar göstermemiştir. 3B koşullarda HDM elemanları ile desteklenmiş doku iskelesinin *in vivo*ya olan benzerliği artırılmış ve hücrelerin mikro ortamlarını oluşturmaları sağlanmıştır. Bu koşullar ortak kültürün uygulanan ilaca karşı direnç göstermesini sağlamıştır.

6. BeWo hücresinin mono kültürü ile 3:1 hücre oranının ortak kültüründeki β -hCG hormonu üretimi hücre canlılığı en yüksek olan PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojelde ve kontrolü PHEMA'da incelenmiştir. BeWo hücresinin mono kültüründe

PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojelindeki β -hCG hormon miktarının en yüksek miktarda salgılandığı görülmüştür. Bu sonuç hücre canlılık analiziyle orantılıdır.

7. MMP-2 ve MMP-9 protein seviyeleri PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojellerde incelenmiş ve protein seviyeleri mono ile ortak kültür ve kriyojel grupları arasında enzim seviyelerinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir.

8. En yüksek hücre canlılığını veren PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojelin 3:1 hücre oranıyla 7.gün boyunca inkübasyonu yapılarak SEM görüntüleri alınmıştır ve görüntüler canlılık sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.

Tez çalışması kapsamında PHEMA temelli kriyojele HDM elemanları ile fonksiyonellik kazandırılmıştır ve plasental hücreler ile mono ve ortak kültürleri yapılmıştır. Böylece *in vivoya* benzeyen 3B kriyojel sistemler oluşturulmuştur. Kriyojel gruplarının biyouyumluluğu değerlendirilmiş olup hücreler üzerinde toksik bir etki yaratmadığı anlaşılmıştır. Hücreler HDM elemanlarını içeren kriyojellerde hücre canlılıklarını beklenenin üzerinde arttırmıştır ve özellikle PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel grubunda hücre canlılığı en yüksek seviyede görülmüştür. Oluşturulan bu plasental kriyojel sistemleri üzerinde SSRI antidepresan grubundan olan Vortiksetin etken maddesinin etkinliği incelenmiştir. Hormon ve protein ifadelerinin miktarları incelenmiştir. Sonuçlar PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojelin plasental model olarak en uygun kriyojel içeriklerine sahip olduğunu göstermiştir. İlerleyen çalışmalarda model üzerine farklı hücre tipleri eklenerek plasentanın karmaşık dokusunun incelenmesi ve daha kapsamlı hormon analizlerinin yapılması amaçlanmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- [1] S.J. Millard, K. Weston-Green and K.A. Newell, The effects of maternal antidepressant use on offspring behaviour and brain development: Implications for risk of neurodevelopmental disorders, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 80 (2017) 743-765.
- [2] K.Y. Çalık and S. Aktaş, Gebelikte Depresyon: Sıklık, Risk Faktörleri ve Tedavisi, *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar*, 3 (2011) 142-162.
- [3] G. Ewing, Y. Tatarchuk, D. Appleby, N. Schwartz and D. Kim, Placental transfer of antidepressant medications: implications for postnatal adaptation syndrome, *Clinical pharmacokinetics*, 54 (2015) 359-370.
- [4] D.R. Morales, J. Slattery, S. Evans and X. Kurz, Antidepressant use during pregnancy and risk of autism spectrum disorder and attention deficit hyperactivity disorder: systematic review of observational studies and methodological considerations, *BMC medicine*, 16 (2018) 1-14.
- [5] C.M. Oefner, A. Sharkey, L. Gardner, H. Critchley, M. Oyen and A. Moffett, Collagen type IV at the fetal-maternal interface, *Placenta*, 36 (2015) 59-68.
- [6] K. Benirschke, G.J. Burton and R.N. Baergen, Early Development of the Human Placenta, *Pathology of the Human Placenta*, (Eds.), Chapter 5, 2012.
- [7] S. Ojosnegros, A. Seriola, A.L. Godeau and A. Veiga, Embryo implantation in the laboratory: an update on current techniques, *Hum Reprod Update*, 27 (2021) 501-530.
- [8] R.S. Barreto, P. Romagnoli, A.D. Cereta, L.M. Coimbra-Campos, A. Birbrair and M.A. Miglino, Pericytes in the placenta: role in placental development and homeostasis, *Pericyte Biology in Different Organs*, (2019) 125-151.

- [9] B. Huppertz, The anatomy of the normal placenta, *J Clin Pathol*, 61 (**2008**) 1296-1302.
- [10] E. Maltepe, A.I. Bakardjiev and S.J. Fisher, The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development, *J Clin Invest*, 120 (**2010**) 1016-1025.
- [11] N.M. Gude, C.T. Roberts, B. Kalionis and R.G. King, Growth and function of the normal human placenta, *Thromb Res*, 114 (**2004**) 397-407.
- [12] P.O. Favaron, J. Borghesi, A.M. Mess, P. Castelucci, G.d.S.S. Matias, R.d.S.N. Barreto and M.A. Miglino, Establishment of 3-dimensional scaffolds from hemochorial placentas, *Placenta*, 81 (**2019**) 32-41.
- [13] M.A. Costa, The endocrine function of human placenta: an overview, *Reprod Biomed Online*, 32 (**2016**) 14-43.
- [14] N. Arumugasaamy, K.D. Rock, C.Y. Kuo, T.L. Bale and J.P. Fisher, Microphysiological systems of the placental barrier, *Adv Drug Deliv Rev*, 161-162 (**2020**) 161-175.
- [15] M.S. Poulsen, E. Rytting, T. Mose and L.E. Knudsen, Modeling placental transport: correlation of *in vitro* BeWo cell permeability and *ex vivo* human placental perfusion, *Toxicol In Vitro*, 23 (**2009**) 1380-1386.
- [16] A.F.a.K.L.A. Amber Young, BeWo cells: an *in vitro* system representing the blood-placental barrier, *Cell Culture Models of Biological Barriers*, (Eds.), CRC Press, 20, **2002**.
- [17] M.Y. Turco and A. Moffett, Development of the human placenta, *Development*, 146 (**2019**).

- [18] S. Sanin, PLASENTA SFEROİD (MİKRO DOKU) MODELİNDE VORTİOKSETİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI, Yüksek Lisans, Hacettepe Üniversite Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2021**.
- [19] Y. Yazır and H. Dalçık, An Important Method in the Investigation of Vascular Pathologies: Endothelial Cell Culture, Kosuyolu Heart Journal, 15 (**2012**) 137-142.
- [20] C. Sturtzel, Endothelial cells, The Immunology of Cardiovascular Homeostasis and Pathology, (**2017**) 71-91.
- [21] B.E. Sumpio, J.T. Riley and A. Dardik, Cells in focus: endothelial cell, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 34 (**2002**) 1508–1512.
- [22] S. Hauser, F. Jung and J. Pietzsch, Human Endothelial Cell Models in Biomaterial Research, Trends Biotechnol, 35 (**2017**) 265-277.
- [23] B. Alberts, Kan Damarları ve Endotel Hücreleri, Hücrenin Moleküler Biyolojisi, (Eds.), 4., **1970**.
- [24] C.J. Turner, K. Badu-Nkansah and R.O. Hynes, Endothelium-derived fibronectin regulates neonatal vascular morphogenesis in an autocrine fashion, Angiogenesis, 20 (**2017**) 519-531.
- [25] R. Demir, Y. Seval and B. Huppertz, Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta, Acta histochemica, 109 (**2007**) 257-265.
- [26] D.J. Medina-Leyte, M. Domínguez-Pérez, I. Mercado, M.T. Villarreal-Molina and L. Jacobo-Albavera, Use of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) as a Model to Study Cardiovascular Disease: A Review, Applied Sciences, 10 (**2020**).

- [27] K. Duval, H. Grover, L.H. Han, Y. Mou, A.F. Pegoraro, J. Fredberg and Z. Chen, Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture, Physiology (Bethesda), 32 (2017) 266-277.
- [28] M. Kapalczynska, T. Kolenda, W. Przybyla, M. Zajaczkowska, A. Teresiak, V. Filas, M. Ibbs, R. Blizniak, L. Luczewski and K. Lamperska, 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures, Arch Med Sci, 14 (2018) 910-919.
- [29] Z. Li and Z. Cui, Three-dimensional perfused cell culture, Biotechnol Adv, 32 (2014) 243-254.
- [30] E. Polat, Üç Boyutlu Hücre Kültürü Sistemlerine Güncel Yaklaşımlar, Namık Kemal Tıp Dergisi, (2020).
- [31] R.C. Boot, G.H. Koenderink and B.P. E., Spheroid mechanics and implications for cell invasion, Advances in Physics: X, 6 (2021) 1978316.
- [32] N. Chaicharoenaudomrung, P. Kunhorm and P. Noisa, Three-dimensional cell culture systems as an *in vitro* platform for cancer and stem cell modeling World Journal of Stem Cells 11 (2019) 1065-1083.
- [33] M. Ravi, V. Paramesh, S.R. Kaviya, E. Anuradha and F.D. Solomon, 3D cell culture systems: advantages and applications, J Cell Physiol, 230 (2015) 16-26.
- [34] M. Razavi, Y. Qiao and A.S. Thakor, Three-dimensional cryogels for biomedical applications, J Biomed Mater Res A, 107 (2019) 2736-2755.
- [35] G. Erturk and B. Mattiasson, Cryogels-versatile tools in bioseparation, J Chromatogr A, 1357 (2014) 24-35.

- [36] T.M.A. Henderson, K. Ladewig, D.N. Haylock, K.M. McLean and A.J. O'Connor, Cryogels for biomedical applications, *J Mater Chem B*, 1 (2013) 2682-2695.
- [37] L.O. Jones, L. Williams, T. Boam, M. Kalmet, C. Oguike and F.L. Hatton, Cryogels: recent applications in 3D-bioprinting, injectable cryogels, drug delivery, and wound healing, *Beilstein J Org Chem*, 17 (2021) 2553-2569.
- [38] P. Öncel, İlaç Salımı İçin Moleküler Baskılanmış Kriyojel Membranlar, (2013).
- [39] G. Bayrak, I. Perçin, A.K. Süloğlu and A. Denizli, Amino acid functionalized macroporous gelatin cryogels: Characterization and effects on cell proliferation, *Process Biochemistry*, 110 (2021) 100-109.
- [40] K.R. Hixon, T. Lu and S.A. Sell, A comprehensive review of cryogels and their roles in tissue engineering applications, *Acta Biomater*, 62 (2017) 29-41.
- [41] A. Memic, T. Colombani, L.J. Eggermont, M. Rezaeeyazdi, J. Steingold, Z.J. Rogers, K.J. Navare, H.S. Mohammed and S.A. Bencherif, Latest Advances in Cryogel Technology for Biomedical Applications, *Advanced Therapeutics*, 2 (2019).
- [42] M. Bakhshpour, N. Idil, I. Perçin and A. Denizli, Biomedical Applications of Polymeric Cryogels, *Applied Sciences*, 9 (2019).
- [43] V.M. Gun'ko, I.N. Savina and S.V. Mikhalovsky, Cryogels: morphological, structural and adsorption characterisation, *Adv Colloid Interface Sci*, 187-188 (2013) 1-46.
- [44] Y. He, C. Wang, C. Wang, Y. Xiao and W. Lin, An Overview on Collagen and Gelatin-Based Cryogels: Fabrication, Classification, Properties and Biomedical Applications, *Polymers (Basel)*, 13 (2021).

- [45] A. Denizli, M. Bakhshpour, S. Akgönüllü, N. İdil, H. Yavuz and M. Andaç, Versatile polymeric cryogels and their biomedical applications, Hacettepe Journal of Biology and Chemistry, (2020).
- [46] A. Sharma, S. Bhat, T. Vishnoi, V. Nayak and A. Kumar, Three-dimensional supermacroporous carrageenan-gelatin cryogel matrix for tissue engineering applications, Biomed Res Int, 2013 (2013) 478279.
- [47] P.A. Shiekh, S.M. Andrabi, A. Singh, S. Majumder and A. Kumar, Designing cryogels through cryostructuring of polymeric matrices for biomedical applications, European Polymer Journal, 144 (2021).
- [48] A. Baimenov, D.A. Berillo, S.G. Pouloupoulos and V.J. Inglezakis, A review of cryogels synthesis, characterization and applications on the removal of heavy metals from aqueous solutions, Advances in colloid and interface science, 276 (2020) 102088.
- [49] M. Qian, L. Niu, W. Qiu, C. Wang, Y. Xiao and H. Zheng, Polyvinyl alcohol cryogel elastic artery phantoms for ultrasonic flow and elasticity measurements, 2013 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS), IEEE, 2013, pp. 864-867.
- [50] B.P. Chan and K.W. Leong, Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations, Eur Spine 17 (2008) 467-479.
- [51] S. Pina, V.P. Ribeiro, C.F. Marques, F.R. Maia, T.H. Silva, R.L. Reis and J.M. Oliveira, Scaffolding Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications, materials 12 (2019) 1824.
- [52] G.-H. Hsiue, J.-A. Guu and C.-C. Cheng, Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) "Imas a drug delivery systemfor pilocarpine, Biomaterials, 22 (2000) 1763-1769.

- [53] S.L. Tomić, M.M. Mičić, S.N. Dobić, J.M. Filipović and E.H. Suljovrujić, Smart poly(2-hydroxyethyl methacrylate/itaconic acid) hydrogels for biomedical application, *Radiation Physics and Chemistry*, 79 (2010) 643-649.
- [54] H. Mackova, Z. Plichta, H. Hlidkova, O. Sedlacek, R. Konefal, Z. Sadakbayeva, M. Duskova-Smrckova, D. Horak and S. Kubinova, Reductively Degradable Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Hydrogels with Oriented Porosity for Tissue Engineering Applications, *ACS Appl Mater Interfaces*, 9 (2017) 10544-10553.
- [55] A. Cretu, R. Gattin, L. Brachais and D. Barbier-Baudry, Synthesis and degradation of poly (2-hydroxyethyl methacrylate)-graft-poly (ϵ -caprolactone) copolymers, *Polymer Degradation and Stability*, 83 (2004) 399-404.
- [56] M. Santin, S.J. Huangt, S. IannaceS, L. AmbrosioS, L. NicolaisS and G. Peluso, Synthesis and characterization of a new interpenetrated poly(2-hydroxyethylmethacrylate)- gelatin composite polymer, *Biomaterials*, 17 (1996) 1459-1467.
- [57] A. Mohammadpour, S. Arjmand, A.S. Lotfi, H. Tavana and M. Kabir-Salmani, Promoting hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells using a novel laminin-containing gelatin cryogel scaffold, *Biochem Biophys Res Commun*, 507 (2018) 15-21.
- [58] A.A. Mariod and H.F. Adam, REVIEW: GELATIN, SOURCE, EXTRACTION AND INDUSTRIAL APPLICATIONS, *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 12 (2013) 135-147.
- [59] T.R. Keenan, *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, (Eds.), 436-448, 2003.
- [60] K. Su and C. Wang, Recent advances in the use of gelatin in biomedical research, *Biotechnology letters*, 37 (2015) 2139-2145.

- [61] Z. KESMEN and A. GÜLLÜCE, GIDA KATKI MADDESİ OLARAK KULLANILABİLECEK REKOMBİNANT JELATİNİN MAYADA (PİCHIA PASTORIS) ÜRETİMİ, Mühendislik Fakültesi, Erciyes Üniversitesi, 2016, pp. 1-99.
- [62] T. Huang, Z.-c. Tu, X. Shangguan, X. Sha, H. Wang, L. Zhang and N. Bansal, Fish gelatin modifications: A comprehensive review, Trends in Food Science & Technology, 86 (2019) 260-269.
- [63] M.C. Gómez-Guillén, B. Giménez, M.E. López-Caballero and M.P. Montero, Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review, Food Hydrocolloids, 25 (2011) 1813-1827.
- [64] M. C Echave, L. S Burgo, J. L Pedraz and G. Orive, Gelatin as biomaterial for tissue engineering, Current pharmaceutical design, 23 (2017) 3567-3584.
- [65] Y.I. Goh and G. Koren, Folic acid in pregnancy and fetal outcomes, J Obstet Gynaecol, 28 (2008) 3-13.
- [66] L. Mahmood, The metabolic processes of folic acid and Vitamin B12 deficiency, Journal of Health Research and Reviews, 1 (2014) 1-5.
- [67] R. Moll and B. Davis, Iron, vitamin B 12 and folate, Medicine, 45 (2017) 198-203.
- [68] K.M. Swart, N.M. van Schoor and P. Lips, Vitamin B12, folic acid, and bone, Curr Osteoporos Rep, 11 (2013) 213-218.
- [69] T.O. Scholl and W.G. Johnson, Folic acid: influence on the outcome of pregnancy, The American journal of clinical nutrition, 71 (2000) 1295-1303.
- [70] Z.S. Lassi, R.A. Salam, B.A. Haider and Z.A. Bhutta, Folic acid supplementation during pregnancy for maternal health and pregnancy outcomes, Cochrane Database of Systematic Reviews, (2013).

- [71] E. Nikolopoulou, G.L. Galea, A. Rolo, N.D. Greene and A.J. Copp, Neural tube closure: cellular, molecular and biomechanical mechanisms, *Development*, 144 (2017) 552-566.
- [72] P. Singh, C. Carraher and J.E. Schwarzbauer, Assembly of fibronectin extracellular matrix, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 26 (2010) 397-419.
- [73] R. Pankov and K.M. Yamada, Fibronectin at a glance, *J Cell Sci*, 115 (2002) 3861-3863.
- [74] J.R. POTTS and I.D. CAMPBELL, Structure and Function of Fibronectin Modules, *Matrix Biology*, 15 (1996) 313-320.
- [75] D.C. Roy and D.C. Hocking, Recombinant fibronectin matrix mimetics specify integrin adhesion and extracellular matrix assembly, *Tissue Eng Part A*, 19 (2013) 558-570.
- [76] J. Patten and K. Wang, Fibronectin in development and wound healing, *Adv Drug Deliv Rev*, 170 (2021) 353-368.
- [77] W.S. To and K.S. Midwood, Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair, *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 4 (2011) 1-17.
- [78] T. Nishida, M. Inui and M. Nomizu, Peptide therapies for ocular surface disturbances based on fibronectin–integrin interactions, *Progress in retinal and eye research*, 47 (2015) 38-63.
- [79] N. Çittçi, S. Kaplan and M.Ç. Rağbetli, Kollagenin ve Kollagen Tiplerinin Yapısı, *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 4 (1987) 389-397.

- [80] J.M.B. Sand, F. Genovese and M.A. Karsdal, Type IV Collagen, Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin, (Eds.), **2016**.
- [81] A. Edvinsson, C. Hellgren, T. Kunovac Kallak, H. Akerud, A. Skalkidou, E. Stener-Victorin, R. Fornes, O. Spigset, S. Lager, J. Olivier and I. Sundstrom-Poromaa, The effect of antenatal depression and antidepressant treatment on placental tissue: a protein-validated gene expression study, BMC Pregnancy Childbirth, 19 (**2019**) 479.
- [82] E. Ozten and G. Sayar, Somatic Treatments in Treatment of Depression During Pregnancy, Psikiyatride Guncel Yaklasimlar - Current Approaches in Psychiatry, (**2014**).
- [83] J.L. Payne and S. Meltzer-Brody, Antidepressant Use During Pregnancy: Current Controversies and Treatment Strategies National Institutes of Health 52 (**2009**) 496-482.
- [84] M. MİRAl and N. Kizilkaya Bejİ, Gebelikte İlaç Kullanımı ve Danışmanlık, Sağlık Bilimleri ve Meslekleri Dergisi, (**2017**) 150-150.
- [85] B.M. SAVRUN, N.B. GÜNEL and İ. BALCIOĞLU, Gebelik ve Laktasyonda Psikotrop İlaç Kullanımı, Perinatoloji Dergisi, 7 (**1999**) 3-8.
- [86] A. Ramsteijn, Antidepressant use during pregnancy: Exploring novel (neuro) biological effects in rat mothers and offspring, (**2020**).
- [87] G. Chen, A.M. Hojer, J. Areberg and G. Nomikos, Vortioxetine: Clinical Pharmacokinetics and Drug Interactions, Clin Pharmacokinet, 57 (**2018**) 673-686.
- [88] C. Evren, Vortioxetine: a comprehensive update on a new-generation antidepressant, Dusunen Adam: The Journal of Psychiatry and Neurological Sciences, (**2021**).

- [89] K.R.V. Rajan, P.S.S.D. Devi, P. Vineela, R. Pasam, H. Allu and P.R. M, A BRIEF SUMMARY ON VORTIOXETINE, World Journal of Pharmaceutical Research, 3 (2014) 914-918.
- [90] E. Karacaoğlu, T-2 Toksininin Kan-Testis Bariyeri Üzerine Etkisinin Serw3 Hücre Hattında Araştırılması, Doktora Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2015.
- [91] L. Nikfarjam and P. Farzaneh, Prevention and detection of Mycoplasma contamination in cell culture, Cell Journal (Yakhteh), 13 (2012) 203.
- [92] H. Jung, S.-Y. Wang, I.-W. Yang, D.-W. Hsueh, W.-J. Yang, T.-H. Wang and H.-S. Wang, Detection and treatment of mycoplasma contamination in cultured cells, Chang Gung medical journal, 26 (2003) 250-258.
- [93] R.I. Freshney, Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications, (Eds.), John Wiley & Sons, 2015.
- [94] A. KORZYŃSKA and M. ZYCHOWICZ, A Method of Estimation of the Cell Doubling Time on Basis of the Cell Culture Monitoring Data, Biocybernetics and Biomedical Engineering, 28 (2008) 75-82.
- [95] H.R. HIRSCH and J. ENGELBERG, Determination of the Cell Doubling-time Distribution from Culture Growth-rate Data, Department of Physiology and Biophysics, 9 (1965) 297-302.
- [96] A. Verma, M. Verma and A. Singh, Animal tissue culture principles and applications, Animal Biotechnology, (Eds.), Elsevier, 2020.
- [97] S. Horvath, Cytotoxicity of drugs and diverse chemical agents to cell cultures, Toxicology, 16 (1980) 59-66.

- [98] Ö.S. Aslantürk, *In vitro* cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages, Genotoxicity-A predictable risk to our actual world, 2 (2018) 64-80.
- [99] M. Garle, J. Fentem and J. Fry, *In vitro* cytotoxicity tests for the prediction of acute toxicity *in vivo*, Toxicology in vitro, 8 (1994) 1303-1312.
- [100] O. TOKUR and A. AKSOY, *In Vitro* Sitotoksosite Testleri, Harran Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 6 (2017) 112-118.
- [101] P. Erkekoğlu and T. Baydar, Güncel *In Vitro* Sitotoksosite Testleri, Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy, 41 (2021) 45-63.
- [102] M. Montagnana, T. Trenti, R. Aloe, G. Cervellin and G. Lippi, Human chorionic gonadotropin in pregnancy diagnostics, Clin Chim Acta, 412 (2011) 1515-1520.
- [103] M. Tsampalas, V. Gridelet, S. Berndt, J.M. Foidart, V. Geenen and S. Perrier d'Hauterive, Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties, J Reprod Immunol, 85 (2010) 93-98.
- [104] J. Choi and J. Smits, Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: origins of difference, Mol Cell Endocrinol, 383 (2014) 203-213.
- [105] L.A. Cole, New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin, Reprod Biol Endocrinol, 7 (2009) 8.
- [106] L.A. Cole, Biological functions of hCG and hCG-related molecules, Reproductive Biology and Endocrinology, 8 (2010) 1-14.
- [107] Y. Seval, G. Akkoyunlu, R. Demir and M. Asar, Distribution patterns of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and -9 and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in the human decidua during early pregnancy, Acta Histochem, 106 (2004) 353-362.

- [108] K. Isaka, S. Usuda, H. Ito, Y. Sagawa, H. Nakamura, H. Nishi, Y. Suzuki, Y.F. Li and M. Takayama, Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts, Placenta, 24 (2003) 53-64.
- [109] P. Henriët and H. Emonard, Matrix metalloproteinase-2: Not (just) a "hero" of the past, Biochimie, 166 (2019) 223-232.
- [110] G. Sawicki, M.W. Radomski, B. Winkler-Lowen, A. Krzymien and L.J. Guilbert, Polarized Release of Matrix Metalloproteinase-2 and -9 from Cultured Human Placental Syncytiotrophoblasts, BIOLOGY OF REPRODUCTION, 63 (2000) 1390–1395.
- [111] E. Staun-Ram, S. Goldman, D. Gabarin and E. Shalev, Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion, Reprod Biol Endocrinol, 2 (2004) 59.
- [112] R. Hamutoğlu, H.E. Bulut, C. Kaloğlu, O. Önder, T. Dağdeviren, M.N. Aydemir and E.M. Korkmaz, The regulation of trophoblast invasion and decidual reaction by matrix metalloproteinase-2, metalloproteinase-7 and metalloproteinase-9 expressions in the rat endometrium Reproductive Medicine and Biology 19 (2020) 385-397.
- [113] P. XU, N. ALFAIDY and J.R.G. CHALLIS, Expression of Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in Human Placenta and Fetal Membranes in Relation to Preterm and Term Labor, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 87 (2002) 1353–1361.
- [114] L.Z. Wu, X.L. Liu and Q.Z. Xie, Osteopontin facilitates invasion in human trophoblastic cells via promoting matrix metalloproteinase-9 *in vitro* Int J Clin Exp Pathol, 8 (2015) 14121-14130.
- [115] F. Vadillo-Ortega, E.E.F. Georgina Gonzalez-Avila, R.J.M. Hanqin Lei, W.G. Stetler-Stevenson and J.F. Strauss, 92-kd Type IV Collagenase (Matrix Metalloproteinase-9) Activity in Human Amniochorion Increases with Labor, American journal of Pathology, 146 (1995) 1-9.

[116] H. Nagase and J.F. Woessner, Jr., Matrix metalloproteinases, *J Biol Chem*, 274 (1999) 21491-21494.

[117] J. Vandooren, P.E. Van den Steen and G. Opdenakker, Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade, *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 48 (2013) 222-272.

[118] R. Mohan, S.K. Chintala, J.C. Jung, W.V. Villar, F. McCabe, L.A. Russo, Y. Lee, B.E. McCarthy, K.R. Wollenberg, J.V. Jester, M. Wang, H.G. Welgus, J.M. Shipley, R.M. Senior and M.E. Fini, Matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) coordinates and effects epithelial regeneration, *J Biol Chem*, 277 (2002) 2065-2072.

[119] B.L. GRUBER, D. SORBI, D.L. FRENCH, M.J. MARCHESE, G.J. NUOVO, R.R. KEW and L.A. ARBEIT, Markedly Elevated Serum MMP-9 (Gelatinase B) Levels in Rheumatoid Arthritis: A Potentially Useful Laboratory Marker, *CLINICAL IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY*, 78 (1996) 161–171.

[120] H.T. Vu, J.M. Shipley, G. Bergers, E.J. Berger, J.A. Helms, D. Hanahan, S.D. Shapiro, R.M. Senior and Z. Werb, MMP-9/Gelatinase B is a Key Regulator of Growth Plate Angiogenesis and Apoptosis of Hypertrophic Chondrocytes, *National Institutes of Health*, 93 (1998) 411-422.

[121] J. L. Skinner, S. C. Riley, Ailsa E. Gebbie, A. F. Glasier and H. O. D. Critchley, Regulation of matrix metalloproteinase-9 in endometrium during the menstrual cycle and following administration of intrauterine levonorgestrel, *Human Reproduction*, 14 (1999) 793–799.

[122] K. Belbachir, R. Noreen, G. Gouspillou and C. Petibois, Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 395 (2009) 829-837.

[123] A. Drozd, K. Matusiak, Z. Setkowicz, M. Ciarach, K. Janeczko, C. Sandt, F. Borondics, D. Horak, M. Babic and J. Chwiej, FTIR microspectroscopy revealed

biochemical changes in liver and kidneys as a result of exposure to low dose of iron oxide nanoparticles, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 236 (2020) 118355.

[124] L. Liverani, M.S. Killian and A.R. Boccaccini, Fibronectin functionalized electrospun fibers by using benign solvents: best way to achieve effective functionalization, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7 (2019) 68.

[125] T.R. Einarson, D. Kennedy and A. Einarson, Do findings differ across research design? The case of antidepressant use in pregnancy and malformations, *Journal of Population Therapeutics and Clinical Pharmacology*, 19 (2012).

[126] E. Balkowiec-Iskra, D.M. Mirowska-Guzel and M. Wielgos, Effect of antidepressants use in pregnancy on foetus development and adverse effects in newborns, *Ginekol Pol*, 88 (2017) 36-42.

[127] R.L. Brent, Utilization of Juvenile Animal Studies to Determine the Human Effects and Risks of Environmental Toxicants During Postnatal Developmental Stages, *Birth Defects Research* 71 (2004) 303-320.

[128] P.C. Barrow, Reproductive toxicology studies and immunotherapeutics, *Toxicology*, 185 (2003) 205/212.

[129] S.J. Jhaveri, M.R. Hynd, N. Dowell-Mesfin, J.N. Turner, W. Shain and C.K. Ober, Release of nerve growth factor from HEMA hydrogel-coated substrates and its effect on the differentiation of neural cells, *Biomacromolecules*, 10 (2009) 174-183.

[130] J.S. Macedo, L. Otubo, O.P. Ferreira, I. de Fátima Gimenez, I.O. Mazali and L.S. Barreto, Biomimetic activated porous carbons with complex microstructures from lignocellulosic residues, *Microporous and Mesoporous Materials*, 107 (2008) 276-285.

- [131] A.M. Beagan, T. Aouak, L.A. AlJuhaiman, A. Alodainy and W. Sharaf Saeed, Poly(2-hydroxyethylmethacrylate-graft-folic acid), synthesis, solubility enhancement, and release dynamic of folic acid, *Designed Monomers and Polymers*, 19 (2016) 479-495.
- [132] D.H. Camacho, S.J.Y. Uy, M.J.F. Cabrera, M.O.S. Lobregas and T.J.M.C. Fajardo, Encapsulation of folic acid in copper-alginate hydrogels and its slow *in vitro* release in physiological pH condition, *Food Research International*, 119 (2019) 15-22.
- [133] J. Kumari and A. Kumar, Development of polymer based cryogel matrix for transportation and storage of mammalian cells, *Sci Rep*, 7 (2017) 41551.
- [134] N. Arumugasaamy, L.E. Ettehadieh, C.Y. Kuo, D. Paquin-Proulx, S.M. Kitchen, M. Santoro, J.K. Placone, P.P. Silveira, R.S. Aguiar, D.F. Nixon, J.P. Fisher and P.C.W. Kim, Biomimetic Placenta-Fetus Model Demonstrating Maternal-Fetal Transmission and Fetal Neural Toxicity of Zika Virus, *Ann Biomed Eng*, 46 (2018) 1963-1974.
- [135] A. Yadav, Removal of heavy metals from emerging cellulosic low-cost adsorbents: a review, (2016).
- [136] D. Qi, S. Wu, M.A. Kuss, W. Shi, S. Chung, P.T. Deegan, A. Kamenskiy, Y. He and B. Duan, Mechanically robust cryogels with injectability and bioprinting supportability for adipose tissue engineering, *Acta Biomater*, 74 (2018) 131-142.
- [137] L. Fassina, E. Saino, L. Visai, M.A. Avanzini, M.G.C.D. Angelis, S.V.V. Francesco Benazzo, P. Dubruel and G. Magenes, Use of a gelatin cryogel as biomaterial scaffold in the differentiation process of human bone marrow stromal cells, In 2010 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology, (2010) 247-250.
- [138] S.K. Seidlits, C.T. Drinnan, R.R. Petersen, J.B. Shear, L.J. Suggs and C.E. Schmidt, Fibronectin-hyaluronic acid composite hydrogels for three-dimensional endothelial cell culture, *Acta Biomater*, 7 (2011) 2401-2409.

- [139] Z. Ma, L. Sagrillo-Fagundes, S. Mok, C. Vaillancourt and C. Moraes, Mechanobiological regulation of placental trophoblast fusion and function through extracellular matrix rigidity, *Sci Rep*, 10 (2020) 5837.
- [140] Y. Gao, C. Sheng, R.-h. Xie, W. Sun, E. Asztalos, D. Moddemann, L. Zwaigenbaum, M. Walker and S.W. Wen, New perspective on impact of folic acid supplementation during pregnancy on neurodevelopment/autism in the offspring children—a systematic review, *PloS one*, 11 (2016) e0165626.
- [141] N. Arumugasaamy, A. Gudelsky, A. Hurley-Novatny, P.C.W. Kim and J.P. Fisher, Model Placental Barrier Phenotypic Response to Fluoxetine and Sertraline: A Comparative Study, *Adv Healthc Mater*, 8 (2019) e1900476.
- [142] M. Sun, S. Liu, J. Gao, T. Meng, X. Xing, C. Chen, H. Chen and Y. Luo, Cyclin G2 Is Involved in the Proliferation of Placental Trophoblast Cells and Their Interactions with Endothelial Cells, *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 26 (2020) e926414-926411.
- [143] A.-E. Kreuder, A. Bolaños-Rosales, C. Palmer, A. Thomas, M.-A. Geiger, T. Lam, A.-K. Amler, U.R. Markert, R. Lauster and L. Kloeke, Inspired by the human placenta: a novel 3D bioprinted membrane system to create barrier models, *Scientific reports*, 10 (2020) 1-14.